



**ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ
ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ
ΤΜΗΜΑ ΙΑΤΡΙΚΗΣ**



ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΚΥΤΤΑΡΟΓΕΝΕΤΙΚΗΣ ΚΑΙ ΜΟΡΙΑΚΗΣ ΓΕΝΕΤΙΚΗΣ

**ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΩΝ ΣΠΟΥΔΩΝ
«ΓΕΝΕΤΙΚΗ ΤΟΥ ΑΝΘΡΩΠΟΥ»**

ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

**«Επίδραση του οξειδωτικού στρες στην ρύθμιση γονιδίων που
σχετίζονται με την αυτοφαγία στην Οστεοαρθρίτιδα»**

**ΑΝΔΡΕΑΣ ΓΟΥΤΑΣ
ΒΙΟΛΟΓΟΣ**

ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΕΠΙΤΡΟΠΗ

**ΤΡΑΧΑΝΑ ΒΑΡΒΑΡΑ (Επιβλέπουσα): Επίκουρη Καθηγήτρια Κυτταρικής
Βιολογίας, Παν/μιου Θεσσαλίας**

ΤΣΕΖΟΥ ΑΣΠΑΣΙΑ (Μέλος): Καθηγήτρια Ιατρικής Γενετικής, Παν/μιου Θεσσαλίας

**ΔΗΜΑΣ ΚΩΣΤΑΝΤΙΝΟΣ (Μέλος): Επίκουρος Καθηγητής Φαρμακολογίας,
Παν/μιου Θεσσαλίας**

ΛΑΡΙΣΑ, 2017

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Η παρούσα έρευνα εκπονήθηκε στο εργαστήριο Κυτταρογενετικής και Μοριακής Γενετικής του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας και στο εργαστήριο Κυτταρογενετικής και Μοριακής Γενετικής του Γενικού Πανεπιστημιακού Νοσοκομίου Λαρίσας, και αποτελεί διπλωματική εργασία στο πλαίσιο του μεταπτυχιακού προγράμματος <<Γενετική του Ανθρώπου>> του τμήματος Ιατρικής του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας.

Πριν την παρουσίαση των αποτελεσμάτων της παρούσας διπλωματικής εργασίας θα ήθελα να ευχαριστήσω τους ανθρώπους που γνώρισα, συνεργάστηκα και αποτέλεσαν σημαντικούς αρωγούς στην διεκπεραίωση της.

Πρώτα απο όλους θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά την επιβλέπουσα καθηγήτρια της διπλωματικής εργασίας, κ. Τραχανά Βαρβάρα για την εμπιστοσύνη που μου έδειξε, καθώς και για την πολύτιμη καθοδήγηση και αμέριστη φιλικότητα της καθόλη την διάρκεια εκπόνησης της εργασίας.

Θα ήθελα να ευχαριστήσω την υπεύθυνη καθηγήτρια για το μεταπτυχιακό πρόγραμμα κ. Τσέζου Ασπασία, που με δέχθηκε στο συγκεκριμένο πρόγραμμα σπουδών αλλά και την συνεχή βοήθεια της σε όλη τη διάρκεια του μεταπτυχιακού. Επίσης, θα ήθελα να ευχαριστήσω τον κ. Δήμα Κωσταντίνο για την συμμετοχή του στην τριμελή επιτροπή.

Τέλος θα ήθελα να ευχαριστήσω όλα τα μέλη του εργαστηρίου Κυτταρογενετικής και Μοριακής του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας και κυρίως την κ. Παπαθανασίου Ιωάννα και κ. Μουρμούρα Ευανθία, οι οποίες με τις γνώσεις τους, τις χρήσιμες συμβουλές τους και την φιλικότητα τους συνέβαλαν ουσιαστικά στην ολοκλήρωση της παρούσα εργασίας.

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Το οξειδωτικό στρες είναι γνωστό ότι εμπλέκεται στην αιτιοπαθογένεια της οστεοαρθρίτιδας (ΟΑ). Επιπλέον η ελαττωματική αυτοφαγία-μιτοφαγία έχειδειχθεί ότι αποτελεί χαρακτηριστικό της ΟΑ ενισχύοντας την παραγωγή ελεύθερων ριζών.

Στην παρούσα εργασία θελήσαμε να διερευνήσουμε τη σχέση οξειδωτικού στρες-αυτοφαγίας και την επίδραση αυτής της σχέσης στην αιτιοπαθογένεια της ΟΑ. Έτσι, μελετήσαμε την επίδραση του εξωγενώς επαγόμενου οξειδωτικού στρες στη ρύθμιση γονιδίων που σχετίζονται με την αυτοφαγία στην ΟΑ. Αρχικά συγκρίθηκαν τα μεταγραφικά επίπεδα των αυτοφαγικών γονιδίων (Atg5, Beclin-1, LC3) σε φυσιολογικά και οστεοαρθρικά χονδροκύτταρα υπό φυσιολογικές συνθήκες. Στη συνέχεια επιδράσαμε τόσο σε φυσιολογικά όσο και σε ΟΑ χονδροκύτταρα με υπεροξείδιο του υδρογόνου (H_2O_2) ενώ επιτρέψαμε στα κύτταρα να ανακάμψουν για διαφορετικά χρονικά διαστήματα. Αναλύσαμε στη συνέχεια τα μεταγραφικά και πρωτεϊνικά επίπεδα των προαναφερόμενων αυτοφαγικών γονιδίων ακριβώς μετά την επίδραση του στρες και έπειτα από τα διαφορετικά διαστήματα ανάκαμψης. Τέλος, αναλύθηκε επιπλέον μέσω μικροσκοπίας φθορισμού η μορφολογία των μιτοχονδρίων σε φυσιολογικά και ΟΑ χονδροκύτταρα.

Τα αποτελέσματα μας έδειξαν στατιστικά σημαντική μείωση των μεταγραφικών επιπέδων των υπό μελέτη αυτοφαγικών γονιδίων στα οστεοαρθρικά χονδροκύτταρα υπό κανονικές συνθήκες. Έπειτα από το οξειδωτικό στρες καταρχάς παρατηρήσαμε διαφορές μεταξύ των τριών γονιδίων στην απόκριση στο στρες καθώς και διαφορετικό πρότυπο ανάκαμψης τους στα φυσιολογικά επίπεδα. Αυτή η απόκριση επιπλέον διάφερε σημαντικά μεταξύ των φυσιολογικών και οστεοαρθρικών χονδροκυττάρων τόσο στο επίπεδο mRNA όσο και σε επίπεδο πρωτεϊνών. Επιπλέον παρατηρήθηκε ύπαρξη μεγάλου ποσοστού μορφολογικά παθολογικών μιτοχονδρίων στα ΟΑ χονδροκύτταρα κάτι που σχεδόν δεν παρατηρήθηκε στα φυσιολογικά.

Οι διαφορές αυτές που παρατηρήσαμε ανάμεσα στα φυσιολογικά και οστεοαρθρικά χονδροκύτταρα παρέχουν νέα δεδομένα για την επίδραση του οξειδωτικού στρες στην αυτοφαγία και την εμπλοκή της στην εμφάνιση ή/και πρόοδο της ΟΑ.

ABSTRACT

It is known that oxidative stress is involved in the pathogenesis of osteoarthritis (OA). Defective autophagy and mitophagy have been shown to align with OA, increasing reactive oxygen species production.

In this study, we studied how oxidative stress affects autophagy and how this correlation affects the pathogenesis of osteoarthritis. Primarily, we focused on the effect of oxidative stress in the regulation of genes that correlate with autophagy in osteoarthritic chondrocytes. Initially, transcription levels of autophagy-related genes such as Atg5, Beclin-1 and LC3 were compared between control and osteoarthritic cells. Moreover, both control and OA-chondrocytes were treated with hydrogen peroxide (H₂O₂) in order to achieve oxidative stress. The cells were allowed certain recovery periods, after which the transcription and protein levels of the three autophagy-related genes were analysed. These analyses were performed right after oxidative stress, as well as for each different recovery period. Morphological differences in the mitochondria between control and OA chondrocytes were also examined.

Our results showed that in control osteoarthritic chondrocytes transcription of the three autophagy-related genes was significantly reduced. Both control and osteoarthritic cells that underwent oxidative stress were found to have different transcription and protein levels of the autophagy-related genes between different recovery times, as well as between control and OA chondrocytes. Furthermore, a significantly larger number of morphologically impaired mitochondria was seen in osteoarthritic cells compared to control chondrocytes.

Differences shown between control and osteoarthritic chondrocytes offer new insight into the effect of oxidative stress in autophagy, and the latter's role in the development and progression of osteoarthritis.

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

ΠΕΡΙΛΗΨΗ.....	3
ABSTRACT	4
A. Εισαγωγή	6
A.1 Οστεοαρθρίτιδα	6
A.2 Οξειδωτικό στρες και OA	15
A.3 Αυτοφαγία και OA	18
A.4 Οξειδωτικό στρες, αυτοφαγία και οστεοαρθρίτιδα	23
A.5 Σκοπός	26
B. Υλικά και Μέθοδοι.....	27
B.1 Ασθενείς και αρθρικά δείγματα.....	27
B.2 Καλλιέργειες χονδροκυττάρων.....	27
B.3 Επίδραση με οξειδωτικό στρες σε 6-well plates	30
B.4 Απομόνωση πρωτεϊνών	31
B.5 Ηλεκτροφόρηση πρωτεϊνών σε πηκτή πολυακρυλαμίδιου-SDS	33
B.6 Ανοσοαποτύπωση πρωτεϊνών – Western Blot	35
B.7 Απομόνωση RNA.....	37
B.8 Σύνθεση συμπληρωματικού DNA (cDNA)	38
B.9 Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης πραγματικού χρόνου	40
B.10 Χρώση μιτοχονδρίων.....	42
Γ. Αποτελέσματα	44
Γ.1 Ποσοτικός προσδιορισμός των επιπέδων mRNA των γονιδίων (Atg5, Beclin-1, LC3II) σε φυσιολογικά και οστεοαρθρικά χονδροκύτταρα.....	44
Γ.2 Ποσοτικός προσδιορισμός των επιπέδων mRNA των γονιδίων (Atg5, Beclin-1, LC3II) σε φυσιολογικά και οστεοαρθρικά χονδροκύτταρα έπειτα από επίδραση με οξειδωτικό στρες (H ₂ O ₂)	48
Γ.3 Ποσοτικός προσδιορισμός των πρωτεϊνικών επιπέδων των γονιδίων (Beclin-1, LC3A/B) σε φυσιολογικά και οστεοαρθρικά χονδροκύτταρα έπειτα από επίδραση με οξειδωτικό στρες (H ₂ O ₂)	54
Γ.4 Έλεγχος της μορφολογίας των μιτοχονδρίων σε φυσιολογικά και οστεοαρθρικά χονδροκύτταρα	58
Δ. Συζήτηση.....	59
Ε. Βιβλιογραφία.....	63

A. Εισαγωγή

1. Οστεοαρθρίτιδα

1.1 Γενικά Στοιχεία

Η οστεοαρθρίτιδα (ΟΑ), συχνά αποκαλούμενη εκφυλιστική νόσος των αρθρώσεων ή εκφυλιστική αρθρίτιδα αποτελεί την πιο κοινή χρόνια πάθηση των αρθρώσεων και θεωρείται μια από τις κύριες αιτίες αναπηρίας στον γενικό πληθυσμό ¹. Η ΟΑ είναι πολυπαραγοντική ασθένεια με πολύπλοκη γενετική συνιστώσα και η παθογένεια της επηρεάζεται από πολλούς γενετικούς και περιβαλλοντικούς παράγοντες ². Η ηλικία αποτελεί έναν από τους σημαντικότερους προδιαθεσικούς παράγοντες για την έναρξη και εξέλιξη της νόσου ³, καθώς το μεγαλύτερο ποσοστό ασθενών είναι μεγαλύτεροι από 65 έτη. Όλες οι αρθρώσεις μπορούν να επηρεαστούν από την ΟΑ, αλλά το ισχίο, τα γόνατα και οι αρθρώσεις των δακτύλων επηρεάζονται πιο συχνά. Οι ώμοι, οι αγκώνες, οι καρποί και οι αστράγαλοι επηρεάζονται σπανιότερα. Συνήθως, τα συμπτώματα εμφανίζονται σε μία ή δύο αρθρώσεις, αν και υπάρχουν περιπτώσεις όπου πλήττονται περισσότερες. Στους ασθενείς παρατηρείται πόνος και σοβαρή παρεμπόδιση των καθημερινών δραστηριοτήτων. Η έλλειψη αποτελεσματικής θεραπείας μέχρι στιγμής υποδεικνύει την ανάγκη για εύρεση νέων θεραπευτικών στρατηγικών ⁴.

1.2 Διάγνωση

Επιπλέον, σε άτομα άνω των 50, όπου οι ακτινογραφικές αλλαγές γίνονται πιο εμφανείς, παρατηρούνται συνήθως και παθολογικά δομικά χαρακτηριστικά στην άρθρωση ⁵. Η διάγνωση της ΟΑ γίνεται συνήθως από το ιστορικό, τα κλινικά ευρήματα και τα ακτινολογικά χαρακτηριστικά. Οι απλές ακτινογραφίες είναι τόσο χαρακτηριστικές ώστε να καθιστούν μη αναγκαίες πιο ειδικές εξετάσεις. Τα 4 κύρια χαρακτηριστικά ακτινολογικά ευρήματα είναι τα ακόλουθα :

- 1. ασύμμετρη στένωση του μεσαρθρίου διαστήματος**
- 2. σκλήρυνση του υποχόνδριου οστού**
- 3. κύστες κοντά στην αρθρική επιφάνεια**

4.οστεόφυτα στα όρια της άρθρωσης

Τα τελευταία 30 χρόνια το σύστημα Kellgren – Lawrence χρησιμοποιήθηκε στις περισσότερες μελέτες είναι το Empire Rheumatism Council System των Kellgren και Lawrence ή K/L score, το οποίο προσδιορίζει τιμές από 0-4, όπου τιμές >2 καθορίζουν ακτινογραφική ΟΑ ⁶.

1.3 Επιδημιολογία

Η οστεοαρθρίτιδα αποτελεί την πιο κοινή μορφή αρθρίτιδας, με το ποσοστό των ασθενών παγκοσμίως να ανέρχεται στο 15% ⁷ και το ποσοστό των ασθενών με ΟΑ γόνατου να είναι 40% στους άνδρες και 47% στις γυναίκες. Υπολογίζεται ότι το ποσοστό θα διπλασιαστεί μέχρι το 2020 λόγω αύξησης του πληθυσμού των υπερηλίκων και της αύξησης του ποσοστού παχυσαρκίας ⁸. Η παραπάνω υπόθεση ενισχύεται και από δεδομένα στα οποία παρατηρείται αύξηση των ατόμων με ΟΑ, ηλικίας άνω των 25 ετών στην Αμερική από 21 εκατομμύρια το 1995 σε 27 εκατομμύρια το 2005 ⁸. Η οστεοαρθρίτιδα είναι μία ηλικιο-σχετιζόμενη ασθένεια, το οποίο υποστηρίζεται από τα ποσοστά επιπολασμού της ασθένειας σε διάφορες ηλικιακές ομάδες. Έχει δειχθεί ότι άτομα ηλικίας από 18-44 έτη θα εμφανίσουν την ασθένεια σε ποσοστό 7,6%,· άτομα ηλικίας από 45-64 έτη θα εμφανίσουν τη πάθηση σε ποσοστό 29,8% και τέλος άτομα ηλικίας άνω των 65 ετών εμφανίζουν τη πάθηση σε ποσοστό άνω του 50% (Centers for Disease Control and Prevention, 2013).

Το ποσοστό των ενηλίκων που έχουν ακτινογραφική ΟΑ χεριού ⁹ είναι 6,8%, ενώ γόνατου 19% ¹⁰. Επιπλέον φαίνεται ότι οι Καυκάσιοι άνδρες εμφανίζουν χαμηλότερο επιπολασμό ακτινογραφικής ΟΑ ισχίου σε σχέση με Αφροαμερικάνους άνδρες (43,8% έναντι 46,6%), όμως μεταξύ Καυκάσιων και Αφροαμερικάνων γυναικών δεν βρέθηκε στατιστικά σημαντική διαφορά (39,4% έναντι 40,3%) ^{11,12}.

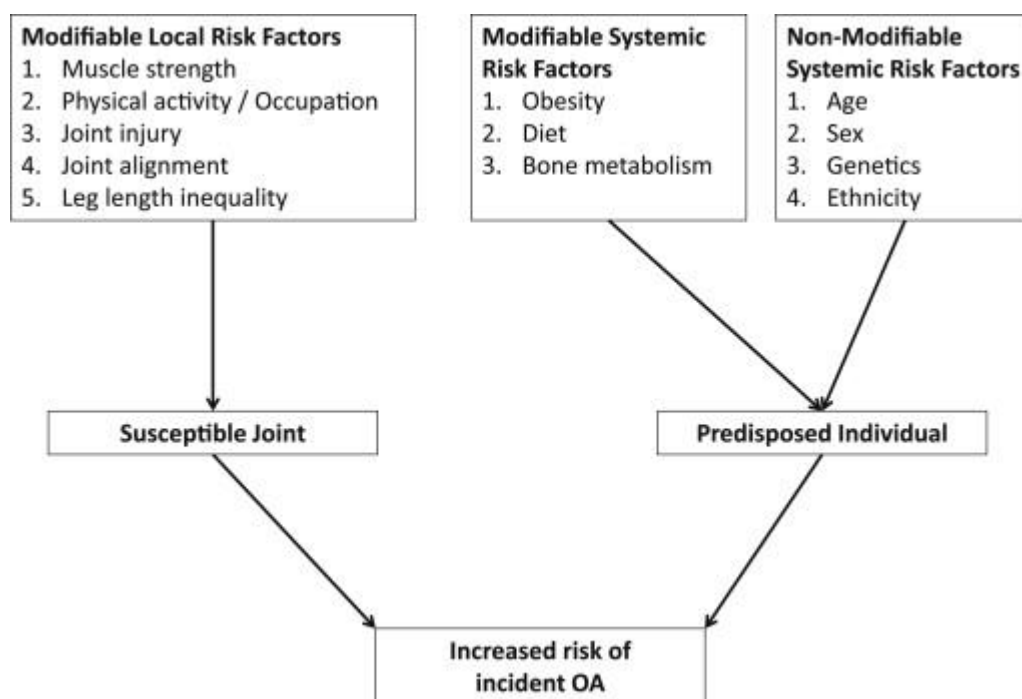
Το ποσοστό των ενηλίκων που έχουν παθολογία ΟΑ χεριού φαίνεται ότι είναι 26% για τις γυναίκες και 13% για τους άνδρες ⁹, ενώ για το γόνατο το αντίστοιχο ποσοστό είναι 17% και για το ισχίο 10% ¹².

Τέλος, έχει δειχθεί ότι οι γενετικοί παράγοντες επηρεάζουν την εμφάνιση και την πρόοδο της νόσου καθώς και την βαρύτητα των συμπτωμάτων σε μεγάλο βαθμό. 40%

- 65% υπολογίζεται η κληρονομικότητα της ΟΑ με το γόνατο να εμφανίζει μικρότερη σε σχέση με το χέρι και το ισχίο ¹³.

1.4 Παράγοντες κινδύνου

Η οστεοαρθρίτιδα φαίνεται να είναι αποτέλεσμα της αλληλεπίδρασης μεταξύ διαφορετικών παραγόντων κινδύνου που δρουν συνδυαστικά όπως φαίνεται στην **Εικόνα 1** ¹⁴. Οι παράγοντες διαχωρίζονται σε συστημικούς και τοπικούς/εμβιομηχανικού με τους συστημικούς να διαιρούνται περαιτέρω στους παράγοντες που δεν μπορούν να τροποποιηθούν, όπως η ηλικία, το φύλο, το γενετικό υπόβαθρο, η εθνικότητα και σε αυτούς που μπορούν μεταξύ των οποίων συγκαταλέγεται ο δείκτης μάζας σώματος, και η διατροφή ¹⁵. Οι διαφορετικοί προδιαθεσικοί παράγοντες εμφανίζουν διαφορετική σημαντικότητα για τις διάφορες αρθρώσεις για τα διάφορα στάδια της ασθένειας καθώς και για την ανάπτυξη και εξέλιξή της.



Εικόνα 1: Οι διάφοροι παράγοντες κινδύνου για την εμφάνιση οστεοαρθρίτιδας ¹⁴.

1.4.1 Συστημικοί παράγοντες κινδύνου

Ηλικία: Η ηλικία είναι από τους ισχυρότερους προδιαθεσικούς παράγοντες για την εμφάνιση ΟΑ ¹⁶. Παρόλα αυτά ο ακριβής μηχανισμός δεν είναι πλήρως κατανοητός. Θεωρείται ότι βιολογικές αλλαγές, όπως η λέπτυνση του χόνδρου, αποδυνάμωση των μυών και το περιβάλλον οξειδωτικού στρες που υπάρχει με το πέρασμα του χρόνου οδηγώντας σε κυτταρική γήρανση, η μειωμένη ικανότητα προσαρμογής στις εμβιομηχανικές προκλήσεις, καθώς και η συσσωρευτική δράση διαφόρων κυρίως τοπικών προδιαθεσικών παραγόντων ¹⁴, έχουν ως τελικό αποτέλεσμα οι αρθρώσεις να γίνονται πιο ευαίσθητες στις αντιξοότητες ⁸.

Φύλο: Το φύλο έχει δείχθει ότι σχετίζεται με την συχνότητα εμφάνισης καθώς και με την σοβαρότητα της νόσου, με τις γυναίκες να εμφανίζουν πιο συχνά και συνήθως πιο βαριά μορφή της ασθένειας ¹⁷. Επιπλέον φαίνεται να εμφανίζουν σοβαρότερη ακτινογραφική εικόνα κυρίως μετά από την εμμηνόπαυση ¹⁷. Λόγω αυτής της συσχέτισης της νόσου με την εμμηνόπαυση θεωρήθηκε ότι μπορεί να ευθύνονται τα οιστρογόνα, κάτι τέτοιο όμως δεν έχει αποδειχθεί με σαφήνεια λόγω ύπαρξης αντικρουόμενων αποτελεσμάτων ¹⁸¹⁹.

Εθνικότητα: Όπως ήδη αναφέρθηκε οι Καυκάσιοι άντρες εμφάνιζαν μικρότερο επιπολασμό από τους Αφροαμερικάνους γεγονός που συσχετίζει και την εθνικότητα με την εμφάνιση της νόσου. Ένα ακόμη παράδειγμα που ενισχύει την άποψη αυτή προέρχεται από την μελέτη Framingham ²⁰, που δείχνει ότι Καυκάσιοι στο Πεκίνο εμφάνιζαν ΟΑ ισχίου και χεριού συχνότερα από τους Κινέζους ενώ τα αντίστοιχα αποτελέσματα για τις γυναίκες ήταν αντίθετα με τις Καυκάσιες να εμφανίζουν σπανιότερα συμπτώματα ΟΑ σε σχέση με τις Κινέζες.

Γενετικό υπόβαθρο: Όπως έχει αναφερθεί η ΟΑ είναι μια πολυπαραγοντική ασθένεια η οποία καθορίζεται γενετικά σε μεγάλο βαθμό, με την συμβολή της να εκτιμάται περίπου στο 60% για χέρι και ισχίο και με μεγαλύτερο του 40% για γόνατο ²¹. Γονίδια όπως υποδοχείς της βιταμίνης D ¹⁶, το κολλαγόνο τύπου 2 ²² και ο GDF5 ²³ (αυξητικός διαφοροποιητικός παράγοντας 5) έχουν συσχετιστεί και θα μπορούσαν να αποτελέσουν μελλοντικούς θεραπευτικούς στόχους. Επιπλέον έχουν συνδεθεί και κάποιοι γενετικοί τόποι με την ΟΑ με την σύνοψη των μέχρι τώρα μελετών, όπως ο 7q22 με ΟΑ γόνατου ²⁴, ο 11q με ΟΑ ισχίου σε γυναίκες ²⁵ και ο GDF5 με γόνατο και ισχίο σε μεταanalύσεις ^{26 27}. Το γενετικό υπόβαθρο φαίνεται να επηρεάζει και τον πόνο

που παρατηρείται σε ΟΑ με χαρακτηριστικό παράδειγμα ο πολυμορφισμός Val158Met στο COMT στην μελέτη κοορτής ²⁸. Μέχρι στιγμής μεγάλες GWAS έχουν αναδείξει την εμπλοκή 18 γενετικών τόπων στην οστεοαρθρίτιδα ²⁹

Παχυσαρκία: Η παχυσαρκία αποτελεί έναν από τους σημαντικότερους παράγοντες κινδύνου για εμφάνιση ΟΑ, κυρίως σε αρθρώσεις όπως το γόνατο και το ισχίο (ισχυρότερη η σχέση γόνατου-ΟΑ) οι οποίες επιβαρύνονται λόγω επίδρασης του μηχανικού φορτίου. ³⁰. Αύξηση του σωματικού βάρους έχει συσχετισθεί και με την αύξηση ακτινογραφικής ΟΑ ³¹ ενώ μείωση βάρους σχετίζεται με μείωση πόνου και αναπηρίας ³². Στα αποτελέσματα από την μελέτη ³¹ παρατηρήθηκε ότι στις γυναίκες οι οποίες μείωσαν τον βάρος τους κατά 5 κιλά μειώθηκε η πιθανότητα εμφάνισης συμπτωματικής ΟΑ γόνατος κατά 50%. Επιπλέον σε ξεχωριστή μελέτη μετα-ανάλυσης παρατηρήθηκε ότι ο κίνδυνος για ΟΑ γόνατος ήταν υψηλότερος κατά 29% σε πληθυσμούς με μεγαλύτερα ποσοστά παχυσαρκίας ³³.

Διατροφή: Η διατροφή όπως στα περισσότερα πολυπαραγοντικά νοσήματα έτσι και στην ΟΑ φαίνεται να σχετίζεται, παρόλα αυτά όμως χρειάζεται επιπλέον μελέτες ώστε να προσδιοριστεί με σαφήνεια η επίδραση των διαφόρων υπο μελέτη διατροφικών παραγόντων. Η βιταμίνη D ήταν από τους πρώτους διατροφικούς παράγοντες που μελετήθηκαν διότι είναι γνωστό ότι η απουσία της κάνει τα οστά λεπτά και εύθραυστα ικανά να παραμορφωθούν. Έχει δειχθεί ότι άτομα με χαμηλά επίπεδα βιταμίνης D έχουν μεγαλύτερη πιθανότητα εμφάνισης ΟΑ γόνατος σε σχέση με άτομα με υψηλά επίπεδα ^{34 35}. Τον κίνδυνο εξέλιξης ΟΑ γόνατος όχι όμως και εμφάνισης της φαίνεται να αυξάνουν τα χαμηλά επίπεδα βιταμίνης C ³⁴. Επιπλέον έχει δειχθεί ότι αυξημένη πρόσληψή της μειώνει την ακτινογραφική ΟΑ γόνατου και την πιθανότητα εμφάνισης πόνου ³⁶. Τέλος υψηλότερα ποσοστά οστεόφυτων και στένωσης στο χέρι καθώς και οστεόφυτα στο γόνατα έχουν συσχετισθεί με μειωμένη πρόσληψη βιταμίνης K ³⁷.

1.4.2 Τοπικοί/εμβιομηχανικοί παράγοντες κινδύνου

Εργασία: Η χρόνια καταπόνηση των αρθρώσεων όπως αναφέρθηκε και στην παχυσαρκία συνεισφέρει στην εμφάνιση ΟΑ και έτσι εργασίες που απαιτούν καθημερινή πολύωρη χρήση συγκεκριμένων αρθρώσεων συνεπικουρούν στην εμφάνιση της νόσου στις αρθρώσεις αυτές. Σε άντρες των οποίων η δουλειά απαιτούσε γονυκλισία σε σχέση με εκείνους που δεν απαιτούσε ο κίνδυνος εμφάνισης οστεοαρθρίτιδας γόνατος ήταν 2 φορές πιο υψηλός ³⁸. Αν τα άτομα ήταν και υπέρβαρα

όπως και αναμενόταν ο κίνδυνος ήταν ακόμη υψηλότερος ³⁹. Κάτι αντίστοιχο παρατηρείται και με τους αγρότες που εμφανίζουν μεγαλύτερο επιπολασμό ΟΑ ισχίου με την εργασία τους να θεωρείται ως βασική αιτία για αυτό ⁴⁰.

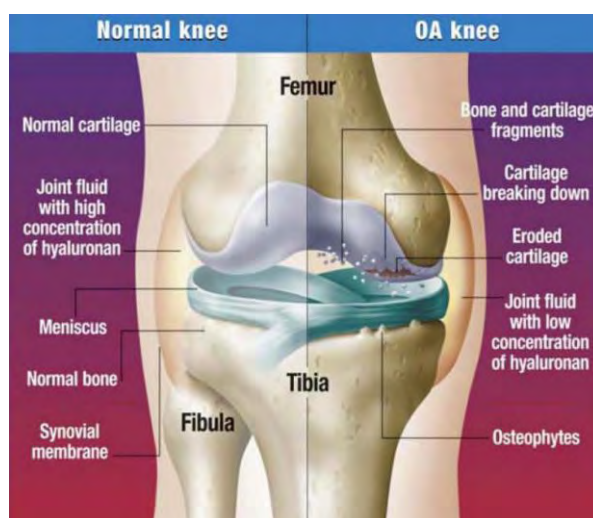
Αθλητισμός: Ο κίνδυνος να εμφανίσουν ΟΑ αθλητές εάν δεν υπάρχει τραυματισμός δεν φαίνεται να είναι αυξημένος με εξαίρεση τους δρομείς μεγάλων αποστάσεων που ίσως υπάρχει μια συσχέτιση ⁴¹. Επιπλέον σε δύο μελέτες παρατηρήθηκε ότι ο αυξημένος κίνδυνος εμφάνισης ΟΑ μεταξύ αθλητών του ποδοσφαίρου σχετίζεται με τους τραυματισμούς αυτών και όχι με το γεγονός ότι έχουν αυξημένη καταπόνηση λόγω πολύωρων προπονήσεων ^{42 43}.

Τραυματισμοί: Το χειρουργείο είναι η πιο κοινή μέθοδος θεραπείας για ρήξη πρόσθιου χιαστού και έχειδειχθεί ότι ο συγκεκριμένος τραυματισμός αποτελεί έναν από τους πλέον ισχυρούς προδιαθεσικούς παράγοντες για ανάπτυξη ΟΑ ⁴². Παρόλα αυτά όμως φαίνεται ότι ασθενείς με ρήξη πρόσθιου χιαστού που τροποποίησαν τον τρόπο ζωής τους για αποφυγή νέων τραυματισμών εμφάνισαν χαμηλά ποσοστά ΟΑ ⁴⁴.

Ευθυγράμμιση δομών: Στην μελέτη κοορτής ⁴⁵δείχθηκε ότι η ευθυγράμμιση γόνατος-ισχίου-αστραγάλου είναι από τους βασικότερους προγνωστικούς δείκτες για ανάπτυξη ΟΑ γόνατος λόγω εσφαλμένης κατανομής του μηχανικού φορτίου στα γόνατα.

1.5 Παθολογία της ΟΑ

Η ΟΑ θεωρείται ότι αποτελεί μια νόσο του αρθρικού χόνδρου αλλά πρόσφατες μελέτες έχουν δείξει ότι είναι μια παθολογική κατάσταση που περιλαμβάνει ολόκληρη την άρθρωση ^{46 47}. Εκτός της αποδόμησης του αρθρικού χόνδρου (αρχικά κυρίως στην επιφάνεια) παρατηρούνται λόγω κυτταρικού και βιομηχανικού στρες και δευτερογενείς αλλαγές όπως σχηματισμός οστεόφυτων, στένωση αρθρώσεων, εκτεταμένη αναδιαμόρφωση του υποχόνδριου οστού, υμενίτιδα, ασβεστοποίηση του χόνδρου, φλεγμονή των αρθρώσεων και εκφυλισμό συνδέσμων και του μηνίσκου ⁴⁸ (**Εικόνα 2**).



Εικόνα 2: Φυσιολογικός και παθολογικός χόνδρος.(1)

1.5.1 Αποδόμηση αρθρικού χόνδρου

Ο αρθρικός χόνδρος είναι ένας υψηλά εξειδικευμένος συνδετικός ιστός των αρθρώσεων. Η κύρια λειτουργία του είναι να παρέχει μια μαλακή (λιπαντική) επιφάνεια για την κίνηση των αρθρώσεων και ένα χαμηλό συντελεστή τριβής για την μετακίνηση των φορτίων ⁴⁹. Φυσιολογικά ο ενήλικος αρθρικός χόνδρος αποτελείται από εξωκυττάρια ουσία (νερό, κολλαγόνο, πρωτεογλυκάνες και μικρή ποσότητα άλας ασβεστίου) και χονδροκύτταρα τα οποία αποτελούν λιγότερο από το 5% του συνολικού όγκου ⁵⁰. Στην ΟΑ όμως τα χονδροκύτταρα δεν μπορούν να διατηρήσουν την ομοιοστασία μεταξύ σύνθεσης και αποδόμησης της εξωκυττάριας ουσίας ⁵¹. αυτό έχει ως συνέπεια αύξηση της περιεκτικότητας σε νερό και μείωση της περιεκτικότητας σε πρωτεογλυκάνη με αποτέλεσμα αποδυνάμωση του δικτύου κολλαγόνου ⁵². Επιπροσθέτως παρατηρείται αυξημένη απόπτωση των χονδροκυττάρων.

1.5.2 σχηματισμός οστεόφυτων

Τα οστεόφυτα είναι οστικές αποφύσεις που συναντώνται στον ινώδη χόνδρο. Εμφανίζονται νωρίς κατα την ανάπτυξη της νόσου και προηγούνται της στένωσης της άρθρωσης. Υπάρχουν τρεις τύποι οστεόφυτων και στους περισσότερους οστεοαρθρικούς φαινοτύπους εμφανίζεται ο ένας εξ αυτών που ονομάζεται οστεοχονδρόφυτο ⁵³.

1.5.3 στένωση άρθρωσης

Η στένωση των αρθρώσεων αποδίδεται γενικά στην απώλεια του αρθρικού χόνδρου. Χρησιμοποιείται μαζί με άλλα χαρακτηριστικά για τον ορισμό της σοβαρότητας της ασθένειας μέσω του K-L system ⁶.

1.5.4 οστική αναδιαμόρφωση

Η αναδιαμόρφωση των οστών στην οστεοαρθρίτιδα εμφανίζεται κυρίως στην υποχόνδρια πλάκα. Το υποχόνδριο οστό στην ΟΑ έχει αυξημένο όγκο και πάχος αλλά είναι πιο αδύναμο και περιέχει λιγότερα μέταλλα σε σύγκριση με το φυσιολογικό ⁵⁴.

1.5.5 φλεγμονή του αρθρικού υμένα (υμενίτιδα)

Ο αρθρικός υμένας αποτελείται από ένα έως τέσσερα στρώματα κυττάρων. Στην ΟΑ παρατηρούνται αρκετές αλλαγές σημαντικότερη από της οποίες είναι η πάχυνση του στρώματος επένδυσης ⁵⁵. Η υμενίτιδα θεωρείται ότι επάγεται αρχικά από την πρωτεολυτική αποδόμηση του χόνδρου ⁴⁷. Τα συστατικά από την αποδόμηση του χόνδρου απελευθερώνονται στο υγρό του υμένα, φαγοκυτταρώνονται από τα μακροφάγα του υμένα εξαπλώνοντας την φλεγμονή της μεμβράνης του υμένα ⁴⁷. Στη συνέχεια παρατηρείται σύνθεση διαμεσολαβητών κυρίως μεταλλοπρωτεϊνών από τον υμένα όπου διαχέονται από το υγρό του υμένα στον χόνδρο και δημιουργούν ένα φαύλο κύκλο με αύξηση αποδόμησης του χόνδρου και αύξηση της φλεγμονής ⁴⁷. Έτσι η φλεγμονή στον αρθρικό υμένα είναι καθοριστική για την αποδόμηση του χόνδρου ⁵⁶.

1.5.6 μηνίσκος

Η αποδόμηση του μηνίσκου είναι συχνή στην ΟΑ όπου ο μηνίσκος εμφανίζεται σχισμένος, ραγισμένος, διαβρωμένος ή εντελώς κατεστραμμένος ⁵⁷. Η αποδόμηση του αρχίζει από το εσωτερικό του και όχι από την επιφάνεια του. Το κολλαγόνο τύπου 1 μειώνεται βαθμιαία από την επιφάνεια προς τα βαθύτερα στρώματα του ιστού, ενώ το

κολλαγόνο τύπου 2 εμφανίζει το αντίστροφο πρότυπο ⁵⁸. Οι πρωτεογλυκάνες εμφανίζονται αυξημένες στον οστεοαρθρικό μηνίσκο ⁵⁸.

1.6 Αντιμετώπιση

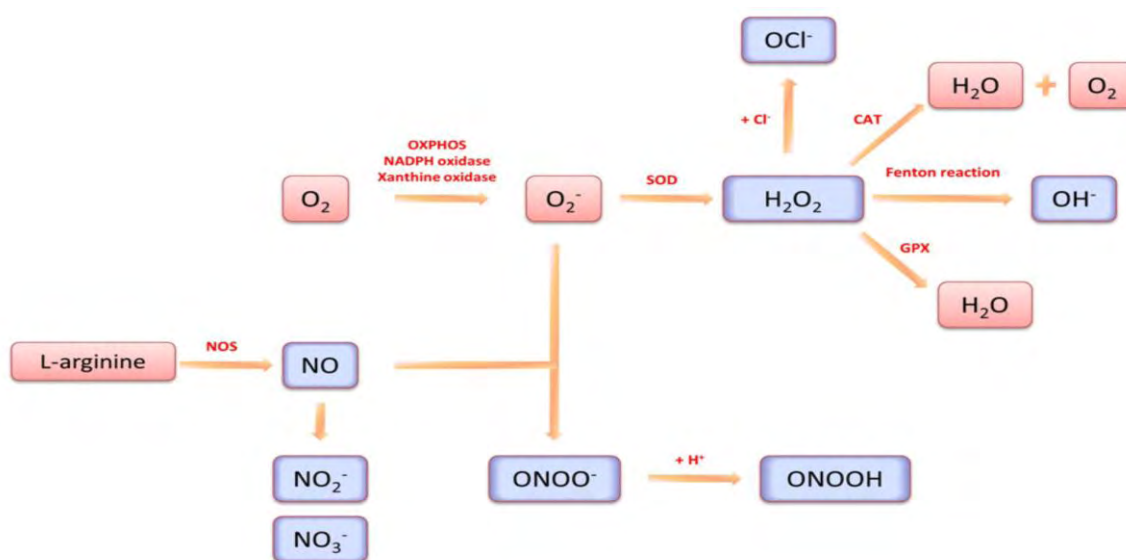
Η οστεοαρθρίτιδα δεν έχει αποτελεσματική θεραπεία μέχρι στιγμής, έτσι βασικός στόχος στην αντιμετώπιση είναι η διαχείριση των συμπτωμάτων της με κυριότερο σκοπό την ελαχιστοποίηση του πόνου και της αναπηρίας της άρθρωσης ⁵⁹. Υπάρχουν δύο τρόποι διαχείρισης της ΟΑ, οι επεμβατικές και οι μη επεμβατικές μέθοδοι. Από τις επεμβατικές μεθόδους η πλέον χρησιμοποιούμενη είναι η ολική αρθροπλαστική ⁶⁰. Στην ολική αρθροπλαστική γίνεται αντικατάσταση μέρους ή ολόκληρης της άρθρωσης με μια συσκευή (πλαστική ή μεταλλική) που σκοπό έχει να αντιγράψει την κίνηση μιας φυσιολογικής, υγιούς άρθρωσης ⁶⁰.

Οι μη επεμβατικές μέθοδοι επιλέγονται συνήθως από τους ασθενείς με πιο ήπια μορφή της νόσου ή ασθενείς μικρότερης ηλικίας (κάτω των 40 ετών) ⁶¹. Οι μη επεμβατικές μέθοδοι συνήθως περιλαμβάνουν τη χρήση φαρμακευτικών ουσιών κυριότερες από τις οποίες είναι τα μη στεροειδή αντιφλεγμονώδη. Επιπλέον παρατηρήθηκαν θετικά αποτελέσματα της χρήσης βλαστοκυττάρων για την θεραπεία της οστεοαρθρίτιδας ⁵⁹. Φυσιοθεραπεία, yoga, και χρήση βοηθημάτων για την κίνηση συμπεριλαμβάνονται στις μη επεμβατικές προσεγγίσεις.

2. Οξειδωτικό στρες και ΟΑ

2.1 ROS

Οι ελεύθερες ρίζες οξυγόνου (ROS) είναι μόρια τα οποία λόγω ύπαρξης ελεύθερου ηλεκτρονίου e^- είναι ασταθή με υψηλή ενεργότητα και μικρή διάρκεια ζωής, προκειμένου να επιτύχουν σταθερότητα ⁶². Υπάρχουν τρεις κύριες πηγές παραγωγής ROS, μέσω της οξειδωτικής φωσφορυλίωσης των μιτοχονδρίων, μέσω του NADPH, και μέσω της οξειδάση της ξανθίνης (κύριο ένζυμο του μεταβολισμού των πουρινών στους νεφρούς και στο ήπαρ) (XO) ⁶³. Η μεγαλύτερη παραγωγή προέρχεται από την οξειδωτική φωσφορυλίωση καθώς το 2-3% του τελικού O_2 που καταναλώνεται μετατρέπεται λανθασμένα σε O_2^- και όχι σε νερό ⁶⁴. Έχουν αναπτυχθεί πολλά αντιοξειδωτικά συστήματα τόσο με τη χρήση ενζύμων όσο και χωρίς. Το βασικότερο όλων είναι το σύστημα SOD/CAT που καταλύει την μετατροπή του O_2^- σε H_2O_2 και O_2 ενώ το CAT την μετατροπή του H_2O_2 σε H_2O και O_2 ^{65 66} (Εικόνα 3). Τα ROS παράγονται σε όλους τους κυτταρικούς τύπους και παίζουν ρόλο στην κυτταρική σηματοδότηση, τη γονιδιακή ρύθμιση και τον κυτταρικό κύκλο μέσω δύο γενικών μηχανισμών : αλλάζοντας (1) την ενδοκυτταρική οξειδοαναγωγική κατάσταση και (2) την οξειδωτική τροποποίηση των πρωτεϊνών ⁶⁷.



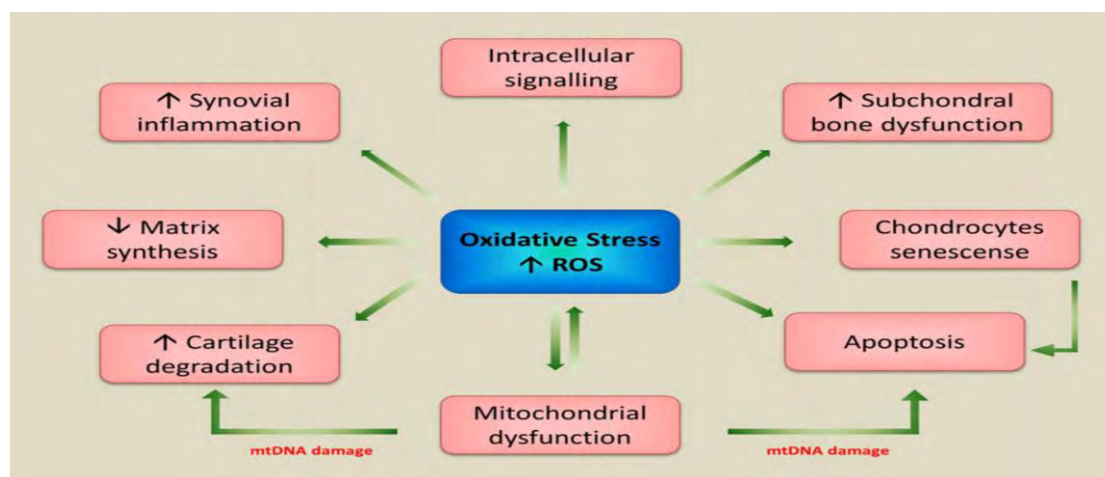
Εικόνα 3: Διαγραμματική αναπαράσταση της παραγωγής των ROS ¹³⁸

2.2 RNS

Το NO παράγεται από την οξείδωση της L-αργινίνης σε L-κιτρουλίνη σε δύο στάδια, μια αντίδραση που καταλύεται από το ένζυμο NOS και στην συνέχεια αντιδρά με άλλα μόρια με τελική παραγωγή NO_3^- και NO_2^- ⁶⁸ (**Εικόνα 3**). Υπάρχουν τρεις ισομορφές NOS, των νευρώνων (nNOS), η ενδοθηλιακή (eNOS) που παράγουν μικρές δόσεις NO με ασβεστο-καλμοδουλινοεξαρτώμενο τρόπο, και η (iNOS) που εκφράζεται σε ποικιλία κυττάρων, για μεγαλύτερα διαστήματα και παράγει μεγαλύτερες δόσεις απαιτώντας μικρές συγκεντρώσεις ασβεστίου ⁶⁸. Τα NOS πολλές φορές αλληλεπιδρούν με τα ROS. Οι λειτουργίες του NO χωρίζονται σε τρεις κατηγορίες : (1) αντιδρούν με μέταλλα (Fe, Cu, Zn) ⁶⁹, (2) ενώνονται με κυστεϊνική θειόλη σχηματίζοντας S-νιτροθειόλη επηρεάζοντας την ενεργότητα μεταγραφικών παραγόντων ⁷⁰, και (3) σε όξινο περιβάλλον με παρουσία O_2^- σχηματίζουν ενεργά μόρια όπως το ONOO^- ⁶⁹.

2.3 Οξειδωτικό Στρές και ΟΑ

Ως οξειδωτικό στρές ορίζεται η διαταραχή της ισορροπίας ανάμεσα στην παραγωγή των ROS και της δράσης των αντιοξειδωτικών μηχανισμών που μπορεί να οδηγήσει στη βλάβη μακρομορίων και στην αποδιοργάνωση της οξειδωαναγωγικής σηματοδότησης ⁶². Υπάρχουν πολλές έρευνες που προτείνουν ότι τα ROS αποτελούν ένα μείζον παράγοντα για ανάπτυξη ΟΑ καθώς διαταράσσουν την ομοιόσταση ολόκληρης της άρθρωσης ^{71 72}.



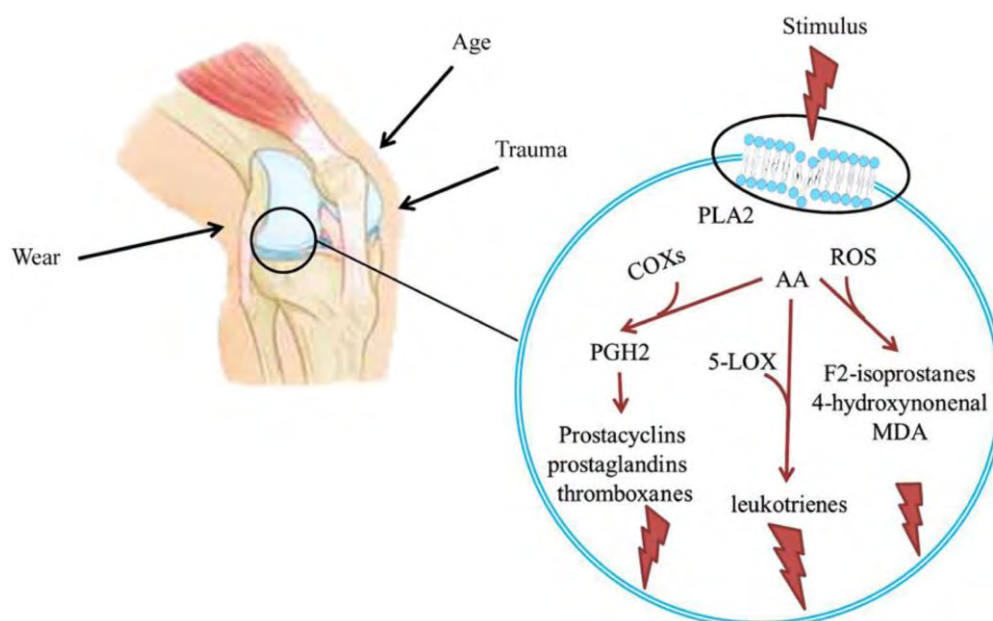
Εικόνα 4: Μηχανισμός παθογένεσης της οστεοαρθρίτιδας που σχετίζεται με οξειδωτικό στρες ¹³⁸.

Το οξειδωτικό στρες όπως φαίνεται και στην **Εικόνα 4** προκαλεί: (1) μιτοχοδριακή δυσλειτουργία (ισχύει και το αντίστροφο) οι οποία προκαλεί απόπτωση και αποικοδόμηση του χόνδρου, (2) φλεγμονή του υμένα, (3) γήρανση των χονδροκυττάρων, (4) απόπτωση, (5) αποικοδόμηση του χόνδρου, (6) δυσλειτουργία του οστού της αρθρωσης, (7) διαταραχές στην ενδοκυτταρική σηματοδότηση και (8) μείωση της σύνθεσης της εξωκυττάριας ουσίας.

2.4 Μηχανισμός δράσης οξειδωτικού στρες στην ΟΑ

Το αραχιδονικό οξύ (AA) είναι ένα λιπαρό οξύ που παράγεται από κυτταρικά φωσφολιπίδια και η δράση του ρυθμίζεται από τη φωσφολιπάση A2 (PLA2). Η οξείδωση του AA από τα ROS παράγει F2-ισοπροστάνες, 4-υδροξυνονενάλη και MDA μέσω μη ενζυματικού μονοπατιού^{73 74}. Τα παράγωγα αυτά μπορούν να αποδομήσουν απευθείας την υαλίνη⁷⁵. Υπάρχουν δύο βασικά μονοπάτια βιοσύνθεσης προϊόντων από το AA μέσω των ενζύμων COXs και 5-LOX. Το COXs μετατρέπει το AA σε PGH2 η οποία μετατρέπεται σε προστανοειδή απευθείας ενώ το 5-LOX μετατρέπει το AA σε LTs (leucotrienes)⁷⁶ (**Εικόνα 5**). Οι μεταβολίτες του AA προωθούν φλεγμονώδη αντίδραση που προκαλεί βλάβη στις κυτταρικές μεμβράνες και εκ νέου παραγωγή AA, σε ένα κύκλο θετικής ανατροφοδότησης. Το PGH2 οδηγεί σε αποδόμηση του χόνδρου μέσω παραγωγή μεταλλοπρωτεασών (MMPs) και φλεγμονωδών κυτταροκινών⁷⁷. Το LTB4 (leucotriene B4) έχει διττό ρόλο στην αποδόμηση του χόνδρου. Αρχικά προσελκύει λευκά αιμοσφαίρια στην άρθρωση οδηγώντας σε παραγωγή ROS μέσω της ενεργοποίησης του NADPH. Αυτό ενεργοποιεί τον προφλεγμονώδη μεταγραφικό παράγοντα NF-kB που προκαλεί την έκφραση IL-1β και TNF-α^{78 79}. Δεύτερον, τα ROS παράγονται ενδογενώς από τα χονδροκύτταρα λόγω απόκρισης στο αρχικό NADPH⁸⁰. Με τη σειρά τους οι κυτταροκίνες, συμπεριλαμβανομένου της IL-1β και του TNF-α επάγουν τα NOS και SOD με αποτέλεσμα την παραγωγή NO και H₂O₂, αντίστοιχα⁸¹. Το H₂O₂ οδηγεί σε αναστολή της σύνθεσης πρωτεογλυκανών, απόπτωση, οξείδωση λιπιδίων, καταστροφή της εξωκυττάριας ουσίας και ενεργοποίηση των MMPs. Το NO συμβάλλει στην αποδόμηση του χόνδρου μέσω διάφορων μηχανισμών, οι οποίοι περιλαμβάνουν παύση της σύνθεσης μορίων όπως το κολλαγόνο και οι πρωτεογλυκάνες, αύξηση της ευαισθησίας σε άλλα οξειδωτικά μόρια (πχ. H₂O₂), αύξηση παραγωγής MMPs και φλεγμονωδών κυττοκινών

συμπεριλαμβανομένου του PGE₂ και πρόκληση αποπτωτικού θανάτου των χονδροκυττάρων.



Εικόνα 5: Μεταβολισμός του AA μέσω οξειδωτικού και ενζυματικών μονοπατιών που σχετίζονται με την ΟΑ ¹³⁹.

3. Αυτοφαγία και ΟΑ

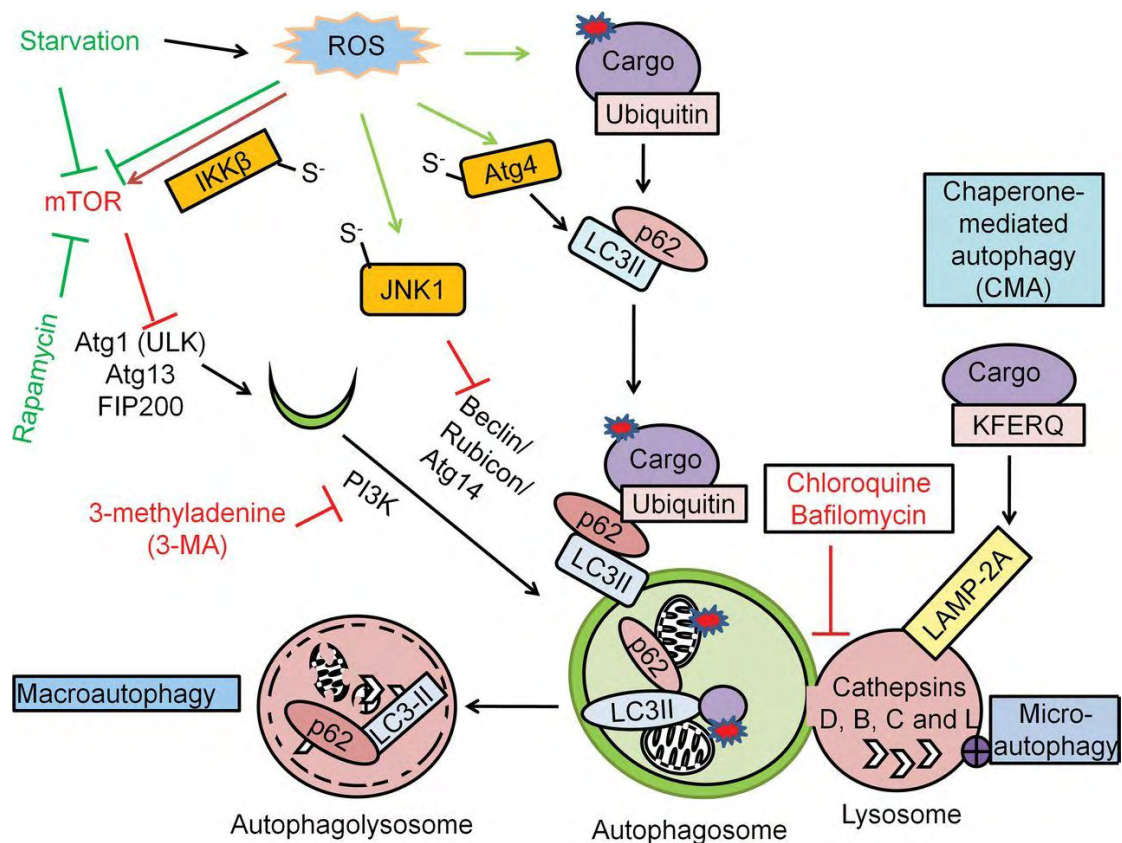
3.1 Γενικά στοιχεία

Η αυτοφαγία είναι ένας απαραίτητος κυτταρικός ομοιοστατικός μηχανισμός για την απομάκρυνση δυσλειτουργικών μακρομορίων και κυτταρικών οργανιδίων - κυρίως μιτοχονδρίων (μιτοφαγία) ⁸². Συναντάται σε μεγάλο εύρος ευκαριωτικών οργανισμών και σε πολλούς κυτταρικούς τύπους κυρίως κάτω από συνθήκες έλλειψης θρεπτικών ουσιών ⁸³. Η αυτοφαγία συνδέεται με ποικιλία σηματοδοτικών μονοπατιών που ανταποκρίνονται στην επάρκεια θρεπτικών ουσιών, την ενεργειακή ισορροπία, τις κυτοκίνες και τους αυξητικούς παράγοντες ⁸². Μέσω της αυτοφαγίας μεταφέρονται στα λυσοσώματα, μακρομόρια, οργανίδια και κυτταροπλασματικά στοιχεία για αποικοδόμηση. Αυτός ο μηχανισμός αποτελεί έναν εκ των δύο συστημάτων αποικοδόμησης των ευκαριωτικών κυττάρων (ο δεύτερος είναι το πρωτεάσωμα) ⁸⁴. Η διαδικασία της αυτοφαγίας υποδιαιρείται σε τρεις ξεχωριστές κατηγορίες με βάση την οδό που ακολουθούν τα στοιχεία για αποικοδόμηση προς το λυσόσωμα ⁸⁵ (**Εικόνα 6**).

α) μικροαυτοφαγία: στην οποία το λυσόσωμα άμεσα τυλίγεται γύρω από τα κυτταροπλασματικά στοιχεία χωρίς ενδιάμεσα στάδια και τα αποικοδομεί ^{86 87}.

β) αυτοφαγία μέσω συνοδών πρωτεϊνών: συνοδές πρωτεΐνες συνδέονται στο πενταπεπτίδιο KFERQ των πρωτεϊνών και στην συνέχεια συνδέονται στην σχετιζόμενη με το λυσόσωμα μεμβρανική πρωτεΐνη-υποδοχέα και μετατοπίζουν την σημασμένη πρωτεΐνη μέσα στο λυσόσωμα για αποικοδόμηση ⁸⁸.

γ) μακροαυτοφαγία: είναι μια διαδικασία με πολλά βήματα που εμπεριέχουν τον σχηματισμό ενός κυστιδίου με διπλή μεμβράνη, του αυτοφαγοσώματος. Όπως θα αναλυθεί στη συνέχεια, το έναυσμα για τη δημιουργία των αυτοφαγοσωμάτων δίνεται από το πρωτεϊνικό σύμπλεγμα mTORC1 (αποτελείται από τα mTOR, Raptor, MLST8, PRAS40, και DEPTOR). Το αυτοφαγόσωμα ωριμάζει και ενώνεται με το λυσόσωμα ώστε να αποδομηθεί το περιεχόμενό του στο όξινο περιβάλλον του λυσοσώματος με την δράση των όξινων υδρολασών. Περισσότερες από 30 πρωτεΐνες που σχετίζονται με την με την αυτοφαγία (AuTophagy-Atgs) συμμετέχουν στα διαδοχικά στάδια ^{89 90}. Επιπλέον συγκεκριμένος συνδυασμός Atgs πρωτεϊνών χρησιμοποιούνται για την αυτοφαγία συγκεκριμένων οργανιδίων και οι πρωτεΐνες αυτές είναι συντηρημένες από τους μύκητες μέχρι τα θηλαστικά ⁸⁹. Η μακροαυτοφαγία είναι η πιο συχνή και η πιο καλά μελετημένη εκ των τριών, και η παρούσα εργασία μελετά αυτήν η οποία θα αναφέρεται στο εξής απλά ως αυτοφαγία. Δυσλειτουργία της αυτοφαγίας σε κύτταρα οδηγεί σε αδυναμία σύνθεσης πρωτεϊνών απαραίτητων για την κυτταρική επιβίωση λόγω δραματικής μείωσης των διαθέσιμων αμινοξέων ⁹¹. Τέλος, φαίνεται να σχετίζεται με την επιβράδυνση της κυτταρικής και πιθανά της οργανισμικής γήρανσης και την πρόληψη και θεραπεία των ηλικιο-σχετιζόμενων ασθενειών ⁹², όπως η οστεοαρθρίτιδα.



Εικόνα 6: Σχηματική αναπαράσταση των τριών διαφορετικών μηχανισμών αυτοφαγίας¹³².

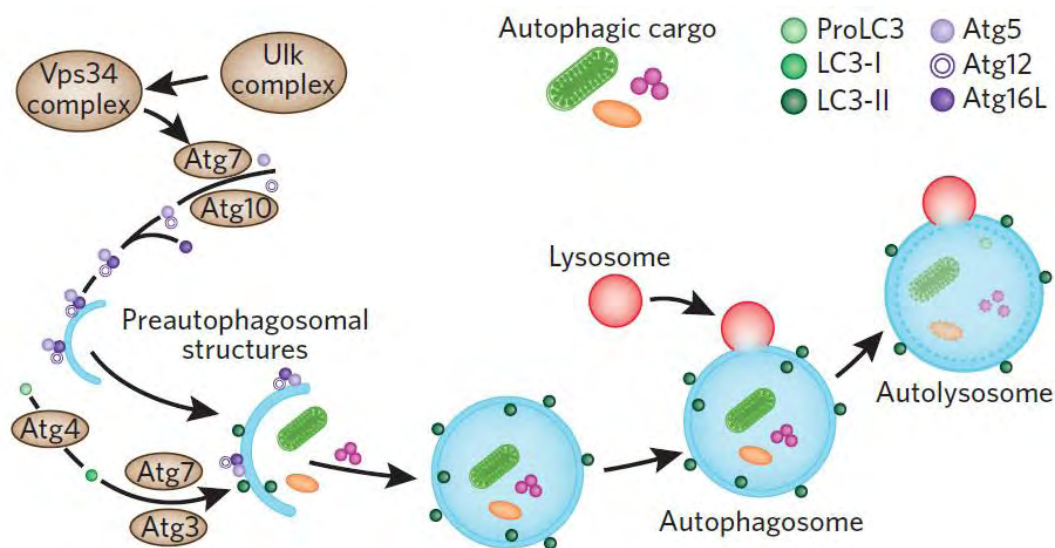
3.2 Σχηματισμός αυτοφαγοσώματος

Η μακροαυτοφαγία απαιτεί την δημιουργία του αυτοφαγοσώματος, το οποίο έχει διπλή μεμβράνη και στην συνέχεια την σύμπτυξή του με το λυσόσωμα. Πριν από τη δημιουργία των αυτοφαγοσωμάτων προέχει η δημιουργία του φαγοφόρου (ή προ-αυτοφαγόσωμα). Όπως αναφέρθηκε προηγουμένως, στη διαδικασία αυτή συμμετέχει το πρωτεϊνικό σύμπλοκο mTORC1⁹³. Το συγκεκριμένο σύστημα επάγει τη σύνθεση πρωτεϊνών προκειμένου τα κύτταρα να αναπτυχθούν και να πολλαπλασιαστούν. Η λειτουργία του mTOR επηρεάζεται από αυξητικούς παράγοντες, θρεπτικά συστατικά, παράγοντες στρες και τα επίπεδα ενέργειας του κυττάρου (τα οποία γίνονται αντιληπτά από αλληλεπίδραση του mTOR με την AMP κινάση). Υπό ευνοϊκές συνθήκες, το mTOR προωθεί αναβολικές διεργασίες⁹⁴. Σε αντίθετη περίπτωση, το σύστημα mTOR μπλοκάρεται (το οποίο μπορεί να επιτευχθεί και τεχνητά μέσω της rapamycin) και ενεργοποιούνται φωσφατάσες οι οποίες αποφωσφοριλιώνουν το Atg13 το οποίο στην συνέχεια ενεργοποιεί το ULK. Πέρα από το Atg13, το ULK ενεργοποιείται και

απευθείας από την AMPK υπό συνθήκες έλλειψης θρεπτικών ουσιών, ενώ αντίθετα σε αφθονία θρεπτικών ουσιών το mTOR αποτρέπει την αλληλεπίδραση AMPK και ULK⁹⁵. Το ULK με τη σειρά του οδηγεί στην στρατολόγηση του FIP200 και όλο το σύστημα συμμετέχει στην δημιουργία της αρχικής δομής του φαγόφορου^{96 97 98}. Η δημιουργία του προαυτοφαγοσώματος απαιτεί και την ύπαρξη του συστήματος Beclin-1 το οποίο αποτελείται από τη beclin-1, VPS34 ή PI3KC3 και την ATG14L ή UVRAG⁹⁰. Μετά τη δημιουργία του φαγοφόρου, ο σχηματισμός των μεμβρανών του αυτοφαγοσώματος προϋποθέτει την συμμετοχή δύο συστημάτων με δράση παρόμοια της ουβικουΐτινης, του Atg5-Atg1 και του LC3-Atg8⁹⁹. Η πρόδρομη μορφή του LC3 (proLC3) μετατρέπεται από την πρωτεάση Atg4B σε LC3-I και στην συνέχεια μέσω μιας αντίδρασης παρόμοιας με ουβικουΐτίνωση η οποία πραγματοποιείται από τα Atg7, Atg3 και Atg16L μετατρέπεται από LC3-I σε LC3-II. Για την μετατροπή του LC3-I σε LC3-II αρχικά το Atg5 συνδέει το Atg3 στο LC3-I και στην συνέχεια προστίθεται στο LC3-I μία ομάδα PE (φωσφατιδυλεθνολαμίνης) από το Atg3 (ένζυμο με δράση παρόμοια μιας E2 λιγάσης) και τελικά την μετατροπή του σε LC3-II. Αυτή η λιπιδίωση επιτρέπει στο LC3-II να εισαχθεί στη μεμβράνη του αυτοφαγοσώματος. Το Atg7 έχει διττό ρόλο στο σχηματισμό του αυτοφαγοσώματος καθώς πέρα από την μετατροπή του LC3-I σε LC3-II συμμετέχει και στην σύνδεση του Atg10 στο Atg12 και τελικά την σύνδεση του Atg5 με το Atg12, μία αντίδραση που καταλύεται από το Atg10 (ένζυμο με δράση παρόμοια μιας E2 λιγάσης)^{100 101 102}. Αυτά τα διαδοχικά βήματα συνδέσεων και αλληλεπιδράσεων είναι απαραίτητα στην δημιουργία του αυτοφαγοσώματος (Εικόνα 7).

3.3 Σχηματισμός αυτολυσοσώματος

Μετά τη δημιουργία του αυτοφαγοσώματος πραγματοποιείται σύμπτυξή του με το λυσόσωμα. Αυτή η σύμπτυξη πιθανώς πραγματοποιείται από την Rab7 και την λυσοσωμική διαμεμβρανική πρωτεΐνη LAMP-2¹⁰³. Στην συνέχεια η αποικοδόμηση του περιεχομένου του αυτοφαγοσώματος πραγματοποιείται από συγκεκριμένες λυσοσωμικές πρωτεάσες όπως τις καθεψίνες D, B, L οι οποίες έχουν διαφορετική ικανότητά αποικοδόμησης τροποποιημένων πρωτεϊνών (Εικόνα 7)¹⁰⁴.



Εικόνα 7: Σχηματική αναπαράσταση της κατασκευής του αυτολυσοσώματος ¹⁴⁰.

3.4 Αυτοφαγία και ΟΑ

Τα επίπεδα των αυτοφαγικών πρωτεϊνών (ULK1, Beclin-1, LC3) έχουν συσχετιστεί με τα στάδια ανάπτυξης ΟΑ. Βρέθηκαν αυξημένες σε ανθρώπινα χονδροκύτταρα ασθενών πρώτων σταδίων ΟΑ ενώ αντίθετα η έκφρασή τους ήταν μειωμένη στα επόμενα στάδια ¹⁰⁵, ενώ μείωση παρατηρήθηκε και με την αύξηση της ηλικίας ¹⁰⁶. Αυτές οι διαφορές στα επίπεδα τους έχουν συσχετιστεί με αυξημένη απόπτωση και μείωση του χόνδρου ¹⁰⁷. Πιθανόν στα αρχικά στάδια ΟΑ η αυτοφαγία ενεργοποιείται ως προστατευτικός μηχανισμός για αποφυγή απόπτωσης των χονδροκυττάρων ενώ στην συνέχεια η παρατεταμένη καταπόνηση υπερβαίνει την ικανότητα του μηχανισμού να επιδιορθώσει της βλάβες με τελικό αποτέλεσμα μείωση της αυτοφαγίας και αύξηση της απόπτωσης των χονδροκυττάρων ^{105 108}. Πολλά δεδομένα ερευνών υποστηρίζουν τον προστατευτικό ρόλο της αυτοφαγίας τόσο για την απόπτωση των χονδροκυττάρων όσο και για την ανάπτυξη ΟΑ. Αρχικά τα επίπεδα των αυτοφαγικών πρωτεϊνών μειώθηκαν έπειτα απο επαγωγή εμφάνισης ΟΑ χειρουργικά σε μοντέλα ποντικών ενώ η απόπτωση αυξήθηκε ¹⁰⁶. Οι ίδιες παρατηρήσεις έγιναν και σε αρθρώσεις γηρασμένων ποντικών ¹⁰⁵. Δεύτερον υπερέκφραση του mTOR παρατηρήθηκε τόσο σε ασθενείς με ΟΑ όσο και σε μοντέλα ζώων με ΟΑ όπως σκύλοι και ποντίκια, το οποίο σχετίζεται με μείωση στην έκφραση αυτοφαγικών γονιδίων ‘κλειδιών’ συμπεριλαμβανομένων των ULK1, Beclin-1, LC3, και αυξημένη απόπτωση χονδοκυττάρων ¹⁰⁹. Τρίτον δείχθηκε

ότι η αυτοφαγία προστατεύει τα κύτταρα από μιτοχονδριακή δυσλειτουργία και απόπτωση χρησιμοποιώντας τον στρεσογόνο μιτοχονδριακό παράγοντα ολιγομυκίνη. Η ολιγομυκίνη προκαλούσε υψηλότερη παραγωγή ROS, υψηλότερα ποσοστά απόπτωσης, υψηλότερη ενεργοποίηση mTOR και χαμηλότερα LC3 ενώ επαναφορά της αυτοφαγίας μέσω rapamycin έχει τα αντίθετα αποτελέσματα ¹¹⁰. Επιπλέον καταργεί τα επίπεδα ROS που προκαλούνται λόγω της IL-1β πιθανών αφαιρώντας τα μιτοχόνδρια που φέρουν βλάβες ¹¹¹. Τέταρτον αποσιώπηση του Atg5 σε χονδροκύτταρα προκαλεί μιτοχονδριακή δυσλειτουργία ενώ παράλληλα ποντίκια με απαληφή του παρουσιάζουν εμφάνιση ΟΑ με αυξημένο ρυθμό απόπτωσης χονδροκυττάρων στους δύο μήνες ¹¹². Πέμπτον, η *in vitro* αποσιώπηση της Beclin-1 σε χονδροκύτταρα οδήγησε σε αυξημένο θάνατο τους ¹¹³. Τέλος σε μοντέλα ποντικών με GFP-LC3 δείχθηκε ότι το μέγεθος και ο αριθμός των αυτοφαγοσωμάτων μειώνονταν με την πάροδο της ηλικίας ¹⁰⁶. Συμπερασματικά, η αυτοφαγία μειώνεται με αύξηση της ηλικίας ¹¹⁴ και η βλάβη μορίων που συμμετέχουν στην αυτοφαγία μειώνει την επιβίωση των χονδροκυττάρων ¹⁰⁷, με αποτέλεσμα την ευαισθησία σε ηλικιοσχετιζόμενη οστεοαρθρίτιδα ¹¹⁴.

4. Οξειδωτικό στρες, αυτοφαγία και οστεοαρθρίτιδα

4.1 Γενικά στοιχεία

Όπως προαναφέρθηκε η ΟΑ είναι μια κατάσταση χρόνιου οξειδωτικού στρες, και ενώ το οξειδωτικό στρες σε χαμηλά επίπεδα παίζει ρόλο στην κυτταρική σηματοδότηση, σε υψηλά επίπεδα προκαλεί βλάβες στις μιτοχονδριακές πρωτεΐνες λόγω οξειδωμένων λιπιδίων ή από την ύπαρξη άφθονων οξειδοαναγωγικών πρωτεϊνών ¹¹⁵. Επιπλέον όπως προαναφέρθηκε η αυτοφαγία αποτελεί ένα βασικό κυτταρικό μηχανισμό ο οποίος οφείλει να διατηρείται σε σωστά επίπεδα προκειμένου να απομακρύνονται από το κύτταρο οι ελαττωματικές πρωτεΐνες ή και ολόκληρα οργάνδια (μιτοφαγία), για την σωστή του λειτουργία ¹¹⁶. Η αυτοφαγία προκειμένου να αφαιρεθούν όλες οι ελαττωματικές πρωτεΐνες και τα οργάνδια που προκαλούνται από το οξειδωτικό στρες ρυθμίζεται από τα επίπεδα του ¹¹⁷. Τα σημαντικότερα βιολογικά μόρια που προκαλούν οξειδωτικό στρες και ταυτόχρονα αποτελούν ρυθμιστές της αυτοφαγίας είναι τα O_2^- , H_2O_2 επειδή δημιουργούνται από ελεγχόμενους μηχανισμούς στο κύτταρο ^{118 119}.

4.2 Ρύθμιση αυτοφαγίας μέσω οξειδωτικού στρες

Η ρύθμιση των αυτοφαγικών επιπέδων μέσω οξειδωτικού στρες μπορεί να προκληθεί με δύο διαφορετικούς τρόπους, είτε άμεσα από τα μόρια που προκαλούν οξειδωτικό στρες (O_2^- , H_2O_2) είτε έμμεσα μέσω μεταγραφικών παραγόντων οι οποίοι ρυθμίζονται από τα συγκεκριμένα μόρια. Από μελέτες σε κύτταρα θηλαστικών έχειδειχθεί ότι η αυτοφαγία επαγόμενη από έλλειψη θρεπτικών ουσιών σχετίζεται με αύξηση οξειδωτικού στρες και επιπλέον και τα δύο αυτά μόρια (O_2^- , H_2O_2) επάγουν την αυτοφαγία^{116 118}. Σε *in vivo* πειράματα επίδραση με εξωγενές H_2O_2 προκαλεί αύξηση της αυτοφαγίας, παρόλα αυτά ο μηχανισμός δεν είναι πλήρως κατανοητός. Επιπρόσθετα δεν είναι γνωστό αν η αύξηση προκαλείται από το H_2O_2 , το οποίο είναι γνωστό ότι τροποποιεί την cys⁸¹ του Atg4 το οποίο επιτρέπει την μετατροπή του LC3-I σε LC3-II¹¹⁶, ή μέσω του O_2^- το οποίο παράγεται δευτερογενώς από τα μιτοχόνδρια λόγω οξειδοαναγωγικών τροποποιήσεων του mETC¹¹⁵. Πολλές μελέτες υποστηρίζουν ότι όντως η ενδογενής παραγωγή του O_2^- παίζει ουσιαστικό ρόλο στην επαγωγή αυτοφαγίας. Αυτή η παρατήρηση προέρχεται από το γεγονός ότι η αυτοφαγία επαγόμενη από έλλειψη θρεπτικών στην κυτταρική σειρά HeLa απαιτεί την μιτοχονδριακή ρύθμιση του O_2^- επειδή ταυτόχρονη υπερέκφραση της MnSOD μειώνει τα επίπεδα του και κατά συνέπεια την αυτοφαγία¹¹⁸. Ενίσχυση στην υπόθεση του ρόλου του μιτοχονδριακού O_2^- αποτελεί και το γεγονός ότι σε περίπτωση ποντικού knockdown για MnSOD με χρήση siRNA παρατηρείται αύξηση της αυτοφαγίας με ταυτόχρονη αύξηση του O_2^- ¹¹⁸. Όπως αναφέραμε η αυτοφαγία μπορεί να ρυθμιστεί και έμμεσα μέσω μεταγραφικών παραγόντων σε απόκριση σε οξειδωτικό στρες. Βασικό παράγοντα αποτελεί το Nrf2, ο συγκεκριμένος παράγοντας ρυθμίζεται αρνητικά από τον κυτταροπλασματικό παράγοντα keap1¹²⁰. Το οξειδωτικό στρες τροποποιεί σε θέση κυστείνης τον keap1, αυτό έχει ως αποτέλεσμα να μην προσδένεται στον Nrf2, και επομένως το πρωτεάσωμα να μην τον αποδομεί, ο οποίος μετατοπίζεται στον πυρήνα και λειτουργεί ως μεταγραφικός παράγοντας¹²¹. Έτσι ξεκινάει η παραγωγή αντιοξειδωτικών ενζύμων¹²¹ καθώς και η παραγωγή αυτοφαγικών γονιδίων όπως το p62 με επερχόμενη αύξηση της αυτοφαγίας¹²². Τέλος ένας ακόμη παράγοντας που αυξάνεται σε απόκριση των (O_2^- , H_2O_2) είναι ο p53¹²³. Η ρύθμιση της αυτοφαγίας μέσω του p53 είναι περίπλοκη καθώς στα σηματοδοτικά μονοπάτια κάτω από το p53 υπάρχουν τόσο γονίδια που μπορεί να αυξήσουν την αυτοφαγία όσο και γονίδια που να την μειώσουν. Το DRAM αποτελεί βασικό γονίδιο το οποίο προωθεί την αυτοφαγία

και ρυθμίζεται μέσω του p53 ¹²⁴. Επιπλέον η σεστρίνες που ρυθμίζονται από το p53 μπορεί να ενισχύσουν την αυτοφαγία μέσω ενεργοποίησης του AMPK το οποίο μπλοκάρει το mTOR ¹²⁵.

4.3 Μιτοφαγία

Απορύθμιση της αυτοφαγίας οδηγεί σε αύξηση του οξειδωτικού στρες κάτι το οποίο έχει δείχθει σε πολλές φαρμακολογικές μελέτες καθώς και σε μελέτες αποσιώπησης γονιδίων. Επιπρόσθετα παύση της αυτοφαγίας σε αρχικά στάδια οδηγεί στην συσσώρευση ουβικουϊτινομένων πρωτεϊνών, αύξηση των ROS και μιτοχονδριακή δυσλειτουργία ¹²⁶. Η μιτοχονδριακή δυσλειτουργία περιλαμβάνει αρκετές αλλαγές τόσο στην μορφολογία όσο και στην λειτουργία των μιτοχονδρίων (κυρίως παρατηρείται σε ασθένειες λυσοσωμικών διαταραχών) ¹²⁷. Μορφολογικά τα μιτοχόνδρια εμφανίζονται σε ποικιλία σχημάτων, έτσι δημιουργήθηκαν τέσσερις κατηγορίες: στίγματα (μορφή κουκίδων), ράβδοι, δικτυωμένα (δίκτυο ινιδίων) και τέλος διογκωμένα μεγάλα και στρογγυλά μιτοχόνδρια ¹²⁸. Οι ράβδοι είναι ένας ενδιάμεσος φαινότυπος μεταξύ σημείων και δικτύων, ενώ τα μεγάλα και στρογγυλά αντιπροσωπεύουν παθολογικά διογκωμένα μιτοχόνδρια ¹²⁸. Ρόλος των μιτοχονδρίων είναι η παραγωγή ενέργειας σε μορφή ATP μέσω της οξειδωτικής φωσφορυλίωσης. Η ύπαρξη μιτοχονδριακού DNA (mtDNA) ξεχωριστού από αυτό του πυρήνα, στο οποίο βασίζεται η παραγωγή συγκεκριμένων πρωτεϊνών για την διεξαγωγή των λειτουργιών του αποτελεί το λόγο που αποκαλούνται ημιαυτόνομα οργανίδια. Παρόλα αυτά όμως η μη ύπαρξη συμπαγούς χρωματινικής δομής και η ταχύτερη αντιγραφή του με ταυτόχρονη έλλειψη αποτελεσματικών επιδιορθωτικών μηχανισμών σε σχέση με το πυρηνικό DNA επιφέρουν 10-20 φορές μεγαλύτερη πιθανότητα για μεταλλάξεις και βλάβες ¹²⁹. Έτσι τα μιτοχόνδρια έχουν συγκεκριμένο χρόνο ημιζωής (ο χρόνος στον οποίο τα μισά μιτοχόνδρια του κυττάρου έχουν αποδομηθεί) που στα φυσιολογικά εγκεφαλικά κύτταρα θηλαστικών υπολογίζεται στις 10-25 μέρες ¹³⁰. Όμως σε κατάσταση έλλειψης θρεπτικών ουσιών και σε καταστάσεις αυξημένου οξειδωτικού στρες ο χρόνος ημιζωής μειώνεται ραγδαία μέσω μιας συγκεκριμένης διαδικασίας που ονομάζεται μιτοφαγία ¹³¹. Μιτοφαγία ορίζεται η στοχευμένη διαδικασία αποδόμησης των μιτοχονδρίων σε απόκριση σε ποικιλία σημάτων συμπεριλαμβανομένων της έλλειψης θρεπτικών ουσιών και σε κατάσταση οξειδωτικού στρες καθώς και σε ειδικά

κυτταρικά σήματα, όπως μέσω σηματοδοτικών πρωτεϊνών ή τροποποίηση μιτοχονδριακών πρωτεϊνών. Η μιτοφαγία αποτελεί έναν βασικό μηχανισμό για την διατήρηση της μιτοχονδριακής ομοιοστασίας ¹³². Η ρύθμιση της μιτοφαγίας πραγματοποιείται είτε σε συνδυασμό με την μακροαυτοφαγία είτε μέσω συγκεκριμένων μιτοφαγικών γονιδίων. Η ενεργοποίηση της AMPK και η μετέπειτα φωσφορυλίωση των ULK1, ULK2 ενεργοποιεί την μακροαυτοφαγία και την μιτοφαγία ταυτόχρονα, ενώ έλλειψη τις AMPK ή των ULK1, ULK2 σε ηπατοκύτταρα έχει ως αποτέλεσμα την συσσώρευση p62, ελαττωματικών πρωτεϊνών καθώς και μη φυσιολογικών μιτοχονδρίων ¹²⁶. Η επιλεκτική μιτοφαγία είναι ξεκάθαρο ότι υπόκειται σε αυστηρή ρύθμιση από ποικιλία πρωτεϊνών όπως (PINK1, parkin, BNIP, Atg32) παρόλα αυτά ο ακριβής μηχανισμός δεν έχει προσδιοριστεί πλήρως ¹³².

5. Σκοπός

Με βάση την βιβλιογραφία γνωρίζουμε την ύπαρξη σχέσης μεταξύ του οξειδωτικού στρες και της αυτοφαγίας αλλά και ενδείξεις που αφορούν στην επίδραση αυτής της σχέσης στην παθογένεια της ΟΑ. Σκοπός της παρούσας μελέτης είναι η διερεύνηση αυτής της σχέσης, μέσω της μελέτης της ρύθμισης από το εξωγενές επαγόμενο οξειδωτικό στρες, γονιδίων που σχετίζονται με την αυτοφαγία και οι πιθανές διαφορές αυτής της ρύθμισης στα οστεοαρθρικά χονδροκύτταρα. Έτσι, αρχικά συγκρίθηκε η έκφραση των γονιδίων αυτοφαγίας Atg5, LC3 και beclin-1 σε οστεοαρθρικά χονδροκύτταρα και σε χονδροκύτταρα υγιών ατόμων και στην συνέχεια η έκφραση αυτή μελετήθηκε ύστερα από πρόκληση οξειδωτικού στρες. Επιπλέον, διερευνήθηκε η πρωτεϊνική τους έκφραση με και χωρίς επίδραση οξειδωτικού στρες. Τέλος, μελετήσαμε την συσχέτιση αυτοφαγίας και οξειδωτικού στρες με τη μορφολογία των μιτοχονδρίων των φυσιολογικών και οστεοαρθρικών χονδροκυττάρων.

B. Υλικά και Μέθοδοι

B.1 Ασθενείς και αρθρικά δείγματα

Για την διεκπεραίωση της εργασίας καλλιεργήθηκαν χονδροκύτταρα που απομονώθηκαν από οστεοαρθρικούς χόνδρους ατόμων, τα οποία είχαν υποβληθεί σε ολική αρθροπλαστική γόνατος ή ισχίου στην Ορθοπεδική κλινική του Πανεπιστημιακού Περιφερειακού Νοσοκομείου Λάρισας. Τα δείγματα των ασθενών που χρησιμοποιήθηκαν στην μελέτη απομονώθηκαν από περιοχές του χόνδρου που παρουσίαζαν υψηλού βαθμού αλλοιώσεις, δηλαδή εμφάνιζαν προχωρημένο στάδιο ΟΑ. Πριν την ολική αρθροπλαστική στην οποία υποβλήθηκαν οι ασθενείς, έγινε ακτινογραφικός έλεγχος και οι ακτινογραφίες ελέγχθηκαν με βάση το σύστημα Kellgren-Lawrence. Ασθενείς με αυτοάνοσα νοσήματα των αρθρώσεων όπως ρευματοειδής αρθρίτιδα, χονδροδυσπλασία, μολυσματική ΟΑ, και μετα-τραυματική ΟΑ αποκλείστηκαν από τη μελέτη.

Ως δείγματα ελέγχου χρησιμοποιήθηκαν χονδροκύτταρα που προέρχονται από φυσιολογικούς χόνδρους ατόμων, τα οποία είχαν υποστεί χειρουργική επέμβαση λόγω κατάγματος ή ακρωτηριασμού και δεν παρουσίαζαν κάποιο ιστορικό για παθήσεις των οστών.

Συνολικά για τον πρώτο κύκλο πειραμάτων, αυτού της σχετικής ποσοτικοποίησης των μεταγραφικών επιπέδων των υπό μελέτη γονιδίων χρησιμοποιήθηκαν 33 δείγματα ασθενών και 28 δείγματα ελέγχου. Ενώ για τις επιδράσεις με το υπεροξείδιο του υδρογόνου (H_2O_2) χρησιμοποιήθηκαν 3 δείγματα ασθενών με ΟΑ και 2 δείγματα ελέγχου.

B.2 Καλλιέργειες χονδροκυττάρων

B.2.1 Υλικά καλλιέργειας

- **Θρεπτικό μέσο καλλιέργειας**

Το θρεπτικό μέσο που χρησιμοποιήθηκε για την καλλιέργεια ήταν το Dulbecco's modified Eagle's medium / Ham's F-12 (DMEM/F-12, Gibco BRL, UK). Στο θρεπτικό πριν την χρήση του προστίθεται ορός εμβρύου βοός (Fetal Bovine Serum, FBS, Gibco) και αντιβιοτικά πενικιλίνη και στρεπτομυκίνη (penicillin-streptomycin, P/S) σε αναλογία 10% και 1% του όγκου του θρεπτικού DMEM

αντίστοιχα. Σε 500ml θρεπτικού υλικού προστίθεται 50ml FBS και 5ml P/S. Το FBS προστίθεται γιατί παρέχει παράγοντες που συμβάλλουν στον κυτταρικό πολλαπλασιασμό. Το έτοιμο θρεπτικό για χρήση διατηρείται στο ψυγείο στους 4°C.

- **Διάλυμα Hank's Balanced Solution (PBS, Gibco)**

Το ρυθμιστικό διάλυμα που χρησιμοποιήθηκε για τις εκπλύσεις των κυττάρων είναι το PBS χωρίς CaCl₂ και MgCl₂. Ρόλος του είναι η σταθεροποίηση του PH της καλλιέργειας. Διατηρείται σε θερμοκρασία δωματίου 25°C.

- **Θρυψίνη**

Η θρυψίνη χρησιμοποιήθηκε για την αποκόλληση των κυττάρων από την φλάσκα καθώς αποτελεί ένζυμο που προκαλεί διάσπαση των συνδέσμων των κυττάρων στην επιφάνεια προσκόλλησης. Κατά την χρήση της, η βέλτιστη θερμοκρασία είναι 37°C, προκειμένου να μην μειώνεται απότομα η θερμοκρασία των χονδροκυττάρων, ενώ διατηρείται στους 4°C.

B.2.2 Συνθήκες καλλιέργειας

Η καλλιέργεια τους πραγματοποιήθηκε σε φλάσκες 25T, χρησιμοποιώντας το έτοιμο θρεπτικό μέσο. Η ανάπτυξη τους έγινε σε επωαστικό κλίβανο (Heraus Istrumanets), σε σταθερή θερμοκρασία στους 37°C, και κατάλληλες συνθήκες υγρασίας και σταθερή εμπλουτισμένη ατμόσφαιρα με 5% CO₂. Η καλλιέργεια πραγματοποιήθηκε σε ειδικό στείρο χώρο και όλοι οι χειρισμοί των κυττάρων έγιναν μέσα σε εστία κάθετης νηματικής ροής προκειμένου να αποφευχθούν εξωτερικές μολύνσεις. Η παρατήρηση των κυττάρων έγινε σε μικροσκόπιο ανάστροφης φάσης (Axiovert S100, Zeiss).

B.2.3 Πρωτόκολλο καλλιέργειας

Τα χονδροκύτταρα έχουν την ικανότητα να προσκολλώνται στην επιφάνεια των μέσων που καλλιεργούνται για τον λόγο αυτό χρησιμοποιείται θρυψίνη για την αποκόλληση τους. Επιπλέον μετά την απομόνωσή τους από τους ιστούς των ασθενών (και από μων ελέγχου) τα χονδροκύτταρα μπορούν εκτός από άμεση καλλιέργεια, να διατηρηθούν στους -150°C. Για την κατάψυξη των κυττάρων, τα κύτταρα μεταφέρονται σε κρυοφιαλίδιο σε συγκέντρωση 4-5 x 10⁶ κύτταρα/ml θρεπτικού υλικού, εμπλουτισμένα με 10% Dimethyl Sulfoxide (DMSO) και 30% FBS, απουσία αντιβιοτικών. Το DMSO χρησιμοποιείται προκειμένου η ψύξη των κυττάρων-θρεπτικού υλικού που θα πραγματοποιηθεί να είναι αργή, ώστε να αποφευχθεί η

δημιουργία κρυστάλλων οι οποίοι πιθανότατα θα κατέστρεφαν την κυτταρική μεμβράνη. Η διαδικασία απόψυξης και η μετέπειτα μεταφορά τους στις φλάσκες για την καλλιέργεια τους περιλαμβάνει:

- Προσθήκη 2ml θρεπτικού υλικού σε πλαστικό σωληνάριο των 15ml (falcon)
- Μεταφορά του κρυοφυαλιδίου με τα κατεψυγμένα κύτταρα στο υδατόλουτρο (37°C) για 15 δευτερόλεπτα
- Μεταφορά του περιεχομένου του κρυοφυαλιδίου στο falcon
- Φυγοκέντρηση των κυττάρων στις 1800 στροφές για 5-7 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου (25°C)
- Απομάκρυνση του υπερκείμενου και επαναδιάλυση του ιζήματος των κυττάρων σε 5ml PBS
- Φυγοκέντρηση των κυττάρων στις 1800 στροφές για 5-7 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου (25°C)
- Απομάκρυνση υπερκείμενου και επαναδιάλυση του ιζήματος σε 2ml θρεπτικού υλικού
- Μεταφορά των κυττάρων σε φλάσκα 25T και προσθήκη 3ml θρεπτικού υλικού
- Επώαση των κυττάρων στον κλίβανο (37°C, 5% CO₂)

Τα κύτταρα μετά την ανάπτυξη τους και την πλήρη κάλυψη της επιφάνειας της φλάσκας διαιρούνται σε δύο νέες φλάσκες και συνεχιζόταν η καλλιέργειά τους με το παρακάτω πρωτόκολλο:

- Απομάκρυνση θρεπτικού υλικού από την φλάσκα
- Ξέπλυμα των κυττάρων με 5ml PBS (δύο φορές)
- Προσθήκη 1ml θρυψίνη και επώαση για 3 λεπτά στον κλίβανο
- Παρατήρηση στο μικροσκόπιο αν έχει επέλθει αποκόλληση των κυττάρων και προσθήκη 5ml θρεπτικού στη φλάσκα για να σταματήσει η δράση της θρυψίνης. (αν δεν έχει επέλθει χρησιμοποιούμε scrapper)
- Μεταφορά του περιεχομένου σε falcon 15ml
- Φυγοκέντρηση των κυττάρων στις 1800 στροφές για 5-7 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου
- Απομάκρυνση του υπερκείμενου και επαναδιάλυση του ιζήματος των κυττάρων σε 5ml PBS

- Φυγοκέντρωση των κυττάρων στις 1800 στροφές για 5-7 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου
- Απομάκρυνση του υπερκείμενου και επαναδιάλυση του ιζήματος των κυττάρων σε 4ml θρεπτικού υλικού
- Μεταφορά 2ml θρεπτικού υλικού σε κάθε νέα φλάσκα και προσθήκη 3ml θρεπτικού υλικού
- Επώαση των κυττάρων στον κλίβανο (37⁰C)

Τα χονδροκύτταρα χρησιμοποιήθηκαν τόσο για απομόνωση RNA όσο και για την απομόνωση πρωτεϊνών.

B.3 Επίδραση με οξειδωτικό στρες σε 6-well plates

Τα δείγματα που προορίζονται για επιδράσεις μετά την πλήρη κάλυψη σε δύο φλάσκες τους διαιρούνται σε δύο 6-well plates από τέσσερα πηγαδάκια στο καθένα με τον ίδιο τρόπο που διαιρούνται σε δύο φλάσκες. Το ένα 6-well plate το έχουμε για απομόνωση πρωτεϊνών ενώ το άλλο για απομόνωση RNA. Το πλεονέκτημα της μεθόδου είναι ότι μπορούμε να επιδράσουμε σε κύτταρα που προέρχονται από την ίδια καλλιέργεια με διαφορετικές ουσίες ή κάτω από διαφορετικές συνθήκες (διαφορετική συγκέντρωση ή διαφορετικός χρόνος επώασης). Όταν τα κύτταρα έχουν καλύψει το 80-90% της επιφάνειας από το κάθε πηγαδάκι η διαδικασία μπορεί να ξεκινήσει. Στην περίπτωση μας η διαφορά μεταξύ των διαφορετικών πηγαδακίων έγκειται στον χρόνο ανάκαμψης, ύστερα από την επίδραση με H₂O₂ ίδιας συγκέντρωσης (200 μM), για μία ώρα. Χρόνος ανάκαμψης είναι ο χρόνος που είχαν τα κύτταρα έπειτα από την επίδραση, σε φυσιολογικές συνθήκες καλλιέργειας. Στο συγκεκριμένη διπλωματική οι χρόνοι ανάκαμψης που επιλέχθηκαν ήταν: 1 ώρα, 6 ώρες και 24 ώρες.

Για την διαδικασία χρησιμοποιήθηκαν τα εξής υλικά:

- Θρεπτικό υλικό DMEM/5%FBS
- Διάλυμα Hank's Balanced Solution (PBS, Gibco)
- Θρυψίνη
- 6-well plates
- Υπεροξείδιο του υδρογόνου (9.8 M, Sigma Aldrich)

Το πρωτόκολλο που ακολουθήθηκε ήταν το εξής:

- Διαχωρισμός μετά από την πλήρη κάλυψη σε δύο φλάσκες από το ίδιο δείγμα σε δύο 6–well plates από τέσσερα πηγαδάκια στο καθένα
- Συνέχεια καλλιέργειας των κυττάρων στα 6–well plates
- Στο 80-90% κάλυψης σε κάθε πηγαδάκι ξεκινάει η διαδικασία επίδρασης
- Δημιουργία διαλύματος θρεπτικού με H_2O_2 (200 μ M)
- Απομάκρυνση θρεπτικού από τα 6–well plates
- Ξέπλυμα με 2ml PBS
- Προσθήκη 2ml θρεπτικού H_2O_2 σε κάθε πηγαδάκι εκτός του πρώτου (χωρίς επίδραση-no treat-control)
- Επώαση για μία ώρα στον κλίβανο
- Απομάκρυνση του θρεπτικού με το H_2O_2 μετά από μία ώρα
- Ξέπλυμα με 2ml PBS
- Προσθήκη 2ml θρεπτικού σε κάθε πηγαδάκι
- Στα αντίστοιχα χρονικά διαστήματα που ορίστηκαν (1h, 6h, 24h) απομάκρυνση του θρεπτικού και αντίστοιχο πρωτόκολλο για απομόνωση RNA ή πρωτεϊνών για κάθε πηγαδάκι

B.4 Απομόνωση πρωτεϊνών

B.4.1 Υλικά απομόνωσης πρωτεϊνών

- Διάλυμα λύσης κυττάρων (Lysis buffer)
30 mM Tris (Invitrogen)
10% Glycerol (Invitrogen)
150 mM NaCl (Sharlau)
1% NP40 (Ambion)
- Αναστολείς πρωτεασών
- Αναστολείς φωσφατασών

B.4.2 Πρωτόκολλο απομόνωσης πρωτεϊνών

- Απομάκρυνση θρεπτικού από τη φλάσκα ή τα πηγαδάκια

- Ξέπλυμα των κυττάρων με PBS δύο φορές (5ml για τις φλάσκες, 2ml για κάθε πηγαδάκι)
- Προσθήκη 1ml θρυψίνης και επώαση για 3 λεπτά στον κλίβανο
- Παρατήρηση στο μικροσκόπιο αν έχει επέλθει αποκόλληση των κυττάρων και προσθήκη 5ml θρεπτικού στη φλάσκα ή 2ml στα πηγαδάκια, για να σταματήσει η δράση της θρυψίνης. (αν δεν έχει επέλθει χρησιμοποιούμε scrapper)
- Μεταφορά του περιεχομένου σε falcon 15ml
- Φυγοκέντρηση των κυττάρων στις 1800 στροφές για 5-7 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου
- Απομάκρυνση του υπερκείμενου και επαναδιάλυση του ιζήματος των κυττάρων σε 5ml PBS
- Φυγοκέντρηση των κυττάρων στις 1800 στροφές για 5-7 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου
- Προσθήκη 100μl διαλύματος λύσης, στο οποίο είχε προστεθεί 15μl αναστολείς πρωτεασών
- Επαναδιάλυση του ιζήματος και μεταφορά του σε eppendorf
- Διατήρηση της πρωτεΐνης στον πάγο για 40 λεπτά και ανάδευση της σε vortex ανα 10 λεπτά
- Φυγοκέντρηση στις 10000 στροφές για 15 λεπτά
- Μεταφορά του υπερκείμενου σε καινούργιο eppendorf
- Αποθήκευση της στους -80°C

B.4.3 Υπολογισμός ποσότητας πρωτεϊνών – μέθοδος Bradford

Ο υπολογισμός έγινε με την μέθοδο Bradford, κατά την οποία μία χρωστική (Coomassie Brilliant Blue G-250), όταν δεσμευτεί σε μία πρωτεΐνη αλλάζει το μέγιστο απορρόφησης από τα 460nm στα 595nm. Έτσι με χρήση δειγμάτων γνωστής συγκέντρωσης πρωτεϊνών δημιουργήσαμε μια πρότυπη καμπύλη συσχέτισης τιμών απορρόφησης με πρωτεϊνικές συγκεντρώσεις. Με βάση αυτήν την καμπύλη υπολογίσαμε τις άγνωστες συγκεντρώσεις πρωτεϊνών των δειγμάτων μας υπολογίζοντας την τιμή της απορρόφησης που προέκυψε από 5μl της άγνωστης συγκέντρωσης πρωτεΐνης σε 495μl διαλύματος Bradford (5%). Τα υλικά που χρησιμοποιήθηκαν ήταν της εταιρίας Bio-Rad (Bio-Rad Protein Assay). Για την δημιουργία της πρότυπης καμπύλης τα βήματα που ακολουθήθηκαν ήταν τα εξής:

- Ποσότητες απο 1μg έως 20μg αλβουμίνης του ορού του βοός (Bovine Serum Albumine-BSA) διαλύθηκαν σε 800μl ddH₂O
- Προσθήκη 200μl χρωστικής σε κάθε δείγμα
- Επώαση μίγματος για 5 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου
- Ήπια ανάδευση των δειγμάτων αρκετές φορές
- Μεταφορά σε 96wells και φωτομέτρηση στα 595nm
- Κατασκευή πρότυπης καμπύλης βάσει των τιμών απορρόφησης των διάφορων συγκεντρώσεων

B.5 Ηλεκτροφόρηση πρωτεϊνών σε πηκτή πολυακρυλαμιδίου-SDS

Η ηλεκτροφόρηση βασίζεται στο γεγονός ότι ένα μόριο με καθαρό φορτίο, όπως πρωτεΐνες, DNA, RNA θα μετακινηθεί σε ένα ηλεκτρικό πεδίο. Η ταχύτητα μετακίνησης (u) μίας πρωτεΐνης (ή κάθε μορίου) σε ένα ηλεκτρικό πεδίο, εξαρτάται από την ένταση του ηλεκτρικού πεδίου (E), το καθαρό φορτίο της πρωτεΐνης (z), και τον συντελεστή τριβής (f):

$$U = E z / f$$

Σε μία ηλεκτροφόρηση πολυακρυλαμιδίου κάτω από αποδιατακτικές συνθήκες, οι πρωτεΐνες διαχωρίζονται κυρίως βάσει του μοριακού βάρους. Το SDS είναι ένα ανιοντικό απορρυπαντικό που δεσμεύεται στις κύριες αλυσίδες των πρωτεϊνών σε αναλογία ενός μορίου SDS ανά δύο αμινοξέα με αποτέλεσμα να καταστρέφονται μη-ομοιοπολικές αλληλεπιδράσεις μιας φυσικής πρωτεΐνης. Έτσι το σύμπλοκο του SDS με την αποδιεταγμένη πρωτεΐνη έχει μεγάλο φορτίο ανάλογο της μάζας της. Το αρνητικό αυτό φορτίο που αποκτά η πρωτεΐνη είναι πολύ μεγαλύτερο από αυτό που είχε αρχικά η φυσική πρωτεΐνη και έτσι το αρχικό φορτίο της θεωρείται αμελητέο. Η μετακίνηση γίνεται σε λεπτή κατακόρυφη στιβάδα και έτσι η μετακίνηση των πολυπεπτιδικών αλυσίδων είναι απολύτως ανάλογη με το λογάριθμο της μάζας τους.

B.5.1 Υλικά ηλεκτροφόρησης πρωτεϊνών

- Διάλυμα χρωστική μπλά της βρωμοφαινόλης (Sample buffer, Invitrogen)
- Αναγωγικό διάλυμα (Reducing buffer, Invitrogen)

- Πηκτή πολυακρυλαμιδίου-SDS (NuPage Novex Tris-Acetate Mini Gels, Invitrogen)
- Μάρτυρας γνωστών μοριακών βαρών πρωτεϊνών (Precision Plus Protein Standards, Bio-Rad)
- Διάλυμα ηλεκτροφόρησης (NuPage MES or MOPS Running buffer, Invitrogen)
- Αντιοξειδωτικό (NuPage Antioxidant, Invitrogen)
- Δις απεσταγμένο νερό (DEMO_{S.A.})

B.5.2 Αποδιάταξη πρωτεϊνών

Πριν την ανοσοαποτύπωση των πρωτεϊνών πραγματοποιείται αποδιάταξη και διαχωρισμός των πρωτεϊνών με ηλεκτροφόρηση

Η συγκέντρωση των πρωτεϊνών που χρησιμοποιήθηκε ήταν 35μg

Το διάλυμα αποδιάταξης περιείχε:

- Πρωτεΐνη: xμl
- Sample buffer: 5μl
- Reducing buffer: 2μl
- ddH₂O: γμl (μέχρι τελικό όγκο 20μl)

τα δείγματα μεταφέρθηκαν σε συσκευή PCR για αποδιάταξη των πρωτεϊνών στους 95°C για 5 λεπτά

B.5.2 Διαχωρισμός πρωτεϊνών

Η διαδικασία που ακολουθήθηκε ήταν η εξής:

- στήσιμο της συσκευής (Bio-Rad)
- προσθήκη 600ml (50ml Running buffer σε 950ml ddH₂O) στο μπροστινό και οπίσθιο μέρος της συσκευής. Στο μεσαίο τμήμα της συσκευής προστίθενται 200ml Running buffer και 500ml Antioxidant
- Φόρτωμα δειγμάτων στην πηκτή πολυακρυλαμιδίου. (στο πρώτο πηγαδάκι φορτώνεται ο μάρτυρας γνωστών μοριακών βαρών πρωτεϊνών)

B.6 Ανοσοαποτύπωση πρωτεϊνών – Western Blot

Έπειτα απο τον διαχωρισμό τους, στόχος είναι να οπτικοποιήσουμε και να ποσοτικοποιήσουμε τα επίπεδα έκφρασης της υπό μελέτης πρωτεΐνης. Προκειμένου να ανιχνευθεί η επιλεγμένη πρωτεΐνη απαιτείται η χρήση ενός αντισώματος που θα προσκολληθεί στην υπό μελέτη πρωτεΐνη καθώς θα την αναγνωρίσει σαν αντιγόνο, και στην συνέχεια ένα δεύτερο αντίσωμα το οποίο θα είναι ειδικό για το πρώτο. Το δεύτερο αντίσωμα συνήθως είναι σημασμένο με το ένζυμο υπεροξειδάση της ραπανίδας (horseradish peroxidase, HRP) με αποτέλεσμα να δημιουργείται σκοτεινή γραμμή σε φίλμ ακτινών X (αυτοραδιογραφία) η οποία αντιπροσωπεύει τα επίπεδα έκφρασης της υπό μελέτης πρωτεΐνη. Η όλη διαδικασία των αντισωμάτων πραγματοποιείται πάνω σε μεμβράνη νιτροκυτταρίνης ή PVDF, η επιφάνειες αυτές βοηθούν τις πρωτεΐνες να αντιδράσουν με το αντίσωμα.

B.6.1 Υλικά ανοσοαποτύπωσης

- Διάλυμα μεταφοράς
 1. 5% Transfer buffer (NuPage Transfer buffer, Invitrogen)
 2. 1% μεθανόλη (Applichem)
- Χαρτί Whitman
- Μεμβράνη PVDF
- Χρωστική μεμβράνης
- Διάλυμα πλύσης
 1. 50mM Tris (Invitrogen)
 2. 150mM NaCl (Sharlau)
 3. 1mM EDTA (Sharlau)
 4. 0.05% Tween (Bio-Rad)
- Σκόνη μπλοκαρίσματος
- Ορός αλβουμίνης βοοειδών (BSA, Invitrogen)
- Ενισχυτικό σήματος ECL (GE Healthcare, Thermo Scientific)
- Rabbit polyclonal anti-Becn-1, anti-LC3A/B, (Cell Signaling)
- Mouse monoclonal anti-actin, 1:1000, #SC5737 (Santa Cruz Biotechnology Inc.)
- Goat anti-rabbit HRP, 1:10000, #196832 (Thermo Scientific)
- Goat anti-mouse HRP, 1:10000, #G21040 (Invitrogen, Life Technologies)

B.6.2 Πρωτόκολλο ανοσοαποτύπωσης πρωτεϊνών

Για την μεταφορά των πρωτεϊνών από την πηκτή στην μεμβράνη χρησιμοποιήθηκε η συσκευή Trans-Blot wet Transfer Cell (Bio-Rad) και η διαδικασία ήταν η εξής:

- Πριν την ολοκλήρωση του διαχωρισμού των πρωτεϊνών επωάζονται σε transfer buffer για 20 λεπτά η μεμβράνη PVDF (αφού έχει πρώτα επωαστεί για 15 δευτερόλεπτα σε μεθανόλη), δύο χαρτάκια Whitman και η πηκτή πολυακριλαμίδιου
- Μετά την ολοκλήρωση του διαχωρισμού των πρωτεϊνών κατασκευάζεται το sandwich (με σειρά τοποθέτησης): 2 χαρτάκια Whitman - μεμβράνη PVDF - πηκτή πολυακριλαμίδιου - 2 χαρτάκια Whitman
- Μεταφορά του sandwich στο κουτί στην συσκευή
- Μεταφορά των πρωτεϊνών στα 100V για 60 λεπτά
- Μετά το τέλος της μεταφοράς ακολουθεί βάψιμο της μεμβράνης με Ponceau, μέχρι να εμφανιστούν οι μπάστες των πρωτεϊνών
- Ξέπλυμα της μεμβράνης με TBST για 10 λεπτά (3 επαναλήψεις)
- Μεταφορά της μεμβράνης σε διάλυμα μπλοκαρίσματος 5% (2,5gr σκόνης 50ml TBST)
- Ξέπλυμα της μεμβράνης με TBST για 10 λεπτά (3 επαναλήψεις)
- Επώαση της μεμβράνης με το πρώτο αντίσωμα στους 4°C με ανάδευση ολονύκτια. Το αντίσωμα έχει διαλυθεί πρώτα σε διάλυμα μπλοκαρίσματος 5%
- Ξέπλυμα της μεμβράνης με TBST για 10 λεπτά (3 επαναλήψεις)
- Επώαση στο δεύτερο αντίσωμα για 1 ώρα σε θερμοκρασία δωματίου με ανάδευση
- Ξέπλυμα της μεμβράνης με TBST για 10 λεπτά (3 επαναλήψεις)

Στη συνέχεια ακολουθεί η αποτύπωση του σήματος των αντισωμάτων (αυτοραδιογραφία). Η διαδικασία που ακολουθήθηκε ήταν η εξής:

- Επώαση της μεμβράνης σε ενισχυτικό σήματος ECL για 3 λεπτά
- Απομάκρυνση του ενισχυτικού με διηθητικό χαρτί και μεταφορά της μεμβράνης σε ειδικό μηχάνημα (UVITEC Alliance) το οποίο είναι συνδεδεμένο με ηλεκτρονικό υπολογιστή

- Τρέξιμο του ανάλογου προγράμματος από τον υπολογιστή (προ) και αναγνώριση του σήματος των μπαντών
- Ποσοτικοποίηση με το πρόγραμμα IMAGE J

B.7 Απομόνωση RNA

B.7.1 Υλικά απομόνωσης RNA

- Trizol (Life Technologies)
- Χλωροφόρμιο (Merck)
- Ισοπροπυλική αλκοόλη (Amersco)
- 70% αιθανόλη (Scharlau)
- RNase-free water (Qiagen)
- PBS (HyClone)
- Θρυψίνη (Life Technologies)

B.7.2 Πρωτόκολλο απομόνωσης RNA

- Απομάκρυνση θρεπτικού υλικού από την φλάσκα
- Ξέπλυμα των κυττάρων με 5ml PBS
- Προσθήκη 1ml θρυψίνης και επώαση για 2-3 λεπτά στον κλίβανο
- Παρατήρηση στο μικροσκόπιο αν έχει επέλθει αποκόλληση των κυττάρων και προσθήκη 5ml θρεπτικού στη φλάσκα ή 2ml στα πηγαδάκια, για να σταματήσει η δράση της θρυψίνης. (αν δεν έχει επέλθει χρησιμοποιούμε scrapper)
- Μεταφορά του περιεχομένου σε falcon 15ml
- Φυγοκέντρηση των κυττάρων στις 1800 στροφές για 5-7 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου
- Απομάκρυνση του υπερκείμενου και επαναδιάλυση του ιζήματος των κυττάρων σε 5ml PBS
- Φυγοκέντρηση των κυττάρων στις 1800 στροφές για 5-7 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου
- Προσθήκη 1-3ml Trizol, αναλόγως του μεγέθους του ιζήματος των κυττάρων
- Επώαση για 5 λεπτά στους 15-30°C στο υδατόλουτρο

- Προσθήκη 0,2ml χλωροφορμίου για κάθε και ανάδευση με vortex για 15 δευτερόλεπτα
- Φυγοκέντρωση στις 12000 στροφές για 15 λεπτά στους 4°C
- Μεταφορά υπερκείμενου σε eppendorf των 2ml
- Προσθήκη 0,5ml ισοπροπυλικής αλκοόλης για κάθε 1ml Trizol
- Φυγοκέντρωση στις 12000 στροφές για 10 λεπτά στους 4°C
- Απομάκρυνση υπερκείμενου και ξέπλυμα του με 1ml 70% αιθανόλης
- Ανάδευση με και φυγοκέντρωση στις 10000 στροφές για 10 λεπτά στους 4°C
- Απομάκρυνση υπερκείμενου και στέγνωμα στον κλίβανο, μέχρι να εξατμιστεί επαρκώς η αιθανόλη
- Διάλυση του RNA σε RNase-free water (περίπου 30μl)
- Επώαση για 10 λεπτά στους 57°C στο υδατόλουτρο
- Αποθήκευση του στους -80°C

Για απομόνωση RNA από wells πραγματοποιείται η ίδια διαδικασία από το στάδιο προσθήκης του Trizol και έπειτα, η διαφορά έγκειται στην αρχή της διαδικασίας στην οποία αφού απομακρύνουμε το θρεπτικό από τα wells και ξεπλύνουμε με 2ml PBS προσθέτουμε 0,5ml Trizol.

B.8 Σύνθεση συμπληρωματικού DNA (cDNA)

Τα RNA που απομονώθηκαν από τα διάφορα δείγματα μετατράπηκαν σε συμπληρωματικό DNA (cDNA) με την μέθοδο αντίστροφης μεταγραφής *in vitro*. Ως εκκινητές χρησιμοποιήθηκαν εξανουκλεοτίδια τυχαίας αλληλουχίας (random hexamers).

B.8.1 Υλικά για την σύνθεση cDNA

- Random hexmers (2,97 μg/μl, invitrogen)
- Kit αντίστροφης μεταγραφής SuperScript III (200U/μl, invitrogen)
- Δοξυριβονουκλεοτίδια (dNTPs 50mM, invitrogen)
- Δις απεσταγμένο νερό ddH₂O (DEMO_{S.A})

B.8.2 Πρωτόκολλο σύνδεσης cDNA

Για την σύνθεση του cDNA χρησιμοποιήθηκε 3 ml RNA από κάθε δείγμα, και η διαδικασία περιλαμβάνει δύο στάδια.

Πρώτο στάδιο: Διάλυση του RNA σε ddH₂O και προσθήκη 1ml Random Primers μέχρι τελικού όγκου 15ml και στην συνέχεια θέρμανση των δειγμάτων στο 65°C για 10 λεπτά, για την αποδιάταξη των δευτεροταγών δομών των μορίων RNA.

Δεύτερο στάδιο: Προσθήκη των υπόλοιπων αντιδραστηρίων στις εξής ποσότητες

- 4μl Ρυθμιστικό διάλυμα 5x
- 2μl dNTPs
- 2μl χλωριούχο μαγνήσιο
- 2μl DTT
- 0,5μl SuperScript III

Και στην συνέχεια ακολούθησε το παρακάτω πρόγραμμα αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης (PCR)

- 37°C, 10 λεπτά
- 25°C, 10 λεπτά
- 37°C, 50 λεπτά
- 70°C, 15 λεπτά
- 4°C, τελική θερμοκρασία

Στην συνέχεια προκειμένου να βεβαιωθούμε ότι η απομόνωση του RNA πραγματοποιήθηκε σωστά και ότι υπάρχει ικανοποιητική ποσότητα του καθώς και να αποφευχθούν τα ψευδώς θετικά αποτελέσματα πραγματοποιήθηκε ενίσχυση των αλληλουχιών ενός γονιδίου αναφοράς, του GAPDH (Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase) δηλαδή ενός γονιδίου που εκφράζεται πάντα στον υπό μελέτη ιστό. Πραγματοποιήθηκε PCR με χρήση κατάλληλων εκκινητών για το GAPDH, για το cDNA κάθε δείγματος.

Primers GAPDH

Forward: -5 GAGTCAACGGATTTGGTCGT 3-

Reverse: -5 GACAAGCTTCCCGTTCTCAG 3-

Το διάλυμα της αντίδρασης (AmpliTaQ Gold 360 Master Mix, Applied Biosystems) για την ανίχνευση του γονιδίου GAPDH περιείχε:

- cDNA 3μl
- ρυθμιστικό διάλυμα 2x 12,5μl
- Εκκινητής F (50p/mol) 1μl
- Εκκινητής R (50p/mol) 1μl
- Δις απεσταγμένο νερό (ddH₂O) 7,5μl

Το πρόγραμμα με τις συνθήκες PCR που εφαρμόστηκε ήταν το εξής:

- Αποδιάταξη στους 95⁰C για 10 λεπτά
- 40 κύκλοι με τα εξής στάδια ενίσχυσης της αλληλουχίας στόχου:
 - (1) Αποδιάταξη στους 95⁰C για 30 δευτερόλεπτα
 - (2) Υβριδοποίηση των εκκινητών με την αλληλουχία στους 60⁰C για 30 δευτερόλεπτα
 - (3) Επιμήκυνση στους 72⁰C για 1 λεπτό
- Τελική επιμήκυνση στους 72⁰C για 7 λεπτά

Στην συνέχεια πραγματοποιήθηκε ηλεκτροφόρηση των δειγμάτων σε πηκτή αгарόζης 3% με μάρτυρα μοριακών βαρών 100bp (Fermentas) προκειμένου να γίνει ο έλεγχος της παρουσίας ή μη του τμήματος που ενισχύθηκε.

B.9 Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης πραγματικού χρόνου (real time PCR)

Όπως και στην αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (Polymerase Chain Reaction, PCR) όπου μέσω του ενζύμου Taq πολυμεράσης από το θερμοφίλο βακτήριο *Thermus aquaticus* και κατάλληλων εκκινητών πραγματοποιείται ενίσχυση μιας συγκεκριμένης ακολουθίας DNA. Έτσι και η real time PCR αποτελεί μία αντίστοιχη τεχνική η οποία επιτρέπει την αξιόπιστη ανίχνευση και παράλληλα μέτρηση των προϊόντων της αντίδρασης PCR για κάθε κύκλο τα οποία αντιστοιχούν άμεσα στο ποσοστό του μητρικού DNA, κατά την έναρξη της, καθώς στο τέλος κάθε κύκλου το προϊόν της αντίδρασης διπλασιάζεται. Ένα από τα καταλληλότερα συστήματα ποσοτικοποίησης αποτελεί το σύστημα ABI 7300 (Applied Biosystems). Τη βασική αρχή του συστήματος αποτελεί η ανίχνευση του φθορισμού των ειδικών φθορίζουσών χημικών ουσιών, που εκπέμπεται κατά την ενσωμάτωσή τους στο DNA του δείγματος που ενισχύεται. Στην παρούσα εργασία χρησιμοποιήθηκε η φθορίζουσα ουσία η οποία συνδέεται επιλεκτικά σε δίκλιωνα μόρια DNA και ενισχύει το φθορισμό της. Υπάρχουν

δύο τρόποι υπολογισμού της αρχικής ποσότητας DNA στην real time PCR, ο απόλυτος και ο σχετικός προσδιορισμός. Στον απόλυτο προσδιορισμό υπολογίζονται με ακρίβεια τα αντίγραφα που υπήρχαν πριν την ενίσχυση στο δείγμα μας για το υπό μελέτη γονίδιο, ενώ στον σχετικό προσδιορισμό υπολογίζεται η ποσότητα των αντιγράφων σε σχέση με την ποσότητα ενός γονιδίου αναφοράς (που εκφράζεται πάντα στο υπό μελέτη ιστό) για το υπό μελέτη δείγμα. Στην παρούσα εργασία πραγματοποιήθηκε σχετικός προσδιορισμός και ως γονίδιο αναφοράς χρησιμοποιήθηκε το GAPDH.

B.9.1 Υλικά για την real time PCR

- cDNA
- ρυθμιστικό διάλυμα που περιέχει τη SYBR Green και ROX (Fermentas)
- Εκκινητές (5μM) για τα γονίδια LC3-II, Beclin-1, ATG5
- Δις απεσταγμένο νερό (ddH₂O) (DEMO)

B.9.2 Πρωτόκολλο και διάλυμα της αντίδρασης για την real time PCR

Το διάλυμα της αντίδρασης (PCR mix) περιείχε:

- | | |
|----------------------|-------|
| • cDNA | 3μl |
| • SYBR Green | 7,5μl |
| • Εκκινητής Forward | 0,3μl |
| • Εκκινητής Reverse | 0,3μl |
| • ddH ₂ O | 3,9μl |

Οι εκκινητές που χρησιμοποιήθηκαν για κάθε γονίδιο ήταν οι εξής:

GAPDH Forward: -GAGTCAACGGATTTGGTCGT-

GAPDH Reverse: -GACAAGCTTCCCGTTCTCAG-

LC3 Forward: -AGCATCCAACCAAAATCCCG-

LC3 Reverse: -TGAGCTGTAAGCGCCTTCTA-

Beclin-1 Forward: -GGCTGAGAGACTGGATCAGG-

Beclin-1 Reverse: -CTGTCCACTGTGCCAGATGT-

Atg5 Forward: -ACCAGAAACACTTCGCTGCT-

Atg5 Reverse: -GACCTTCAGTGGTCCGGTAA-

Οι συνθήκες που εφαρμόστηκαν για την ενίσχυση του cDNA ήταν οι εξής:

- αποδιάταξη στους 95⁰C
- 45 κύκλοι στους οποίους πραγματοποιείται ενίσχυση της αλληλουχίας-στόχου σε 3 στάδια:
 - a) Αποδιάταξη στους 95⁰C για 15 δευτερόλεπτα
 - b) Υβριδοποίηση-σύνδεση των εκκινητών στους 60⁰C για 60 δευτερόλεπτα
 - c) Επιμήκυνση στους 72⁰C για 30 δευτερόλεπτα
- Τελική επιμήκυνση στους 72⁰C για 10 λεπτά

B.9.3 Στατιστική ανάλυση

Για την στατιστική επεξεργασία των αποτελεσμάτων χρησιμοποιήθηκε το στατιστικό πρόγραμμα SPSS 22 και πιο συγκεκριμένα οι δοκιμασίες independent-samples T-test και Mann Whitney. Ως όριο στατιστικής σημαντικότητας θεωρήθηκε η τιμή p-value < 0,05 ενώ τα αποτελέσματα παρουσιάζονται ως μέσες τιμές με την τυπική απόκλιση (mean+standard deviation, SD).

B.10 Χρώση μιτοχονδρίων

Για την χρώση μιτοχονδρίων, ζώντα κύτταρα τα οποία αναπτύσσονταν πάνω σε καλυπτρίδες επωάστηκαν με τους MitoTracker probes (Invitrogen) οι οποίοι διαχέονται μέσω τις πλασματικής μεμβράνης και προσκολλώνται σε ενεργά μιτοχόνδρια και τα σημαίνουν με χρωστική η οποία μπορεί να παρατηρηθεί κάτω από φθορίζον μικροσκόπιο. Στην συνέχεια οι καλυπτρίδες με τα κύτταρα τα οποία έχουν σημειωθεί πλέον μπορούν να μονιμοποιηθούν με κάποιο κλασικό μονιμοποιητικό κυττάρων, όπως η παραφορμαλδεΰδη.

B.10.1 Υλικά για την χρώση μιτοχονδρίων

- MitoTracker probes Kit (Invitrogen)
- DMSO
- PBS (HyClone)
- Θρεπτικό υλικό DMEM
- Triton X-100

- Φορμαλδεΰδη (3,7%)

B.10.2 Πρωτόκολλο χρώσης μιτοχονδρίων

Αρχικά πρέπει να αραιώσουμε το stock solution σε DMSO ώστε να δημιουργήσουμε το working solution το οποίο θα πρέπει να έχει τελική συγκέντρωση 1mM, και το οποίο αποθηκεύεται στους -20⁰C. Στη συνέχεια από το working solution προετοιμάζουμε το τελικό διάλυμα το οποίο θα έχει την επιθυμητή συγκέντρωση και θα είναι έτοιμο για χρήση στα κύτταρα, χρησιμοποιώντας σκέτο θρεπτικό. Η συγκέντρωση που επιλέχθηκε είναι τα 50mM. Τέλος αφού έχουμε έτοιμο και το τελικό μας διάλυμα με την επιθυμητή συγκέντρωση μπορεί να ξεκινήσει η διαδικασία της επώασης στις καλυπτρίδες με τα κύτταρα. Τα βήματα είναι τα εξής:

- Αφαίρεση θρεπτικού από τα wells στα οποία υπάρχουν οι καλυπτρίδες με τα ζώντα κύτταρα
- Ξέπλυμα με 2ml PBS
- Προσθήκη του σκέτου θρεπτικού με τους probes για τα μιτοχόνδρια
- Επώαση για 30 λεπτά στους 37⁰C στον κλίβανο
- Αφαίρεση του σκέτου θρεπτικού με τους probes
- Ξέπλυμα με προθερμασμένο σκέτο θρεπτικό μέσο DMEM
- Προσθέτω 3,7% φορμαλδεΰδη σε πλήρες θρεπτικό μέσο για 15 λεπτά
- Αφαίρεση θρεπτικού-φορμαλδεΰδης 3,7%
- Ξέπλυμα με σκέτο θρεπτικό μέσο DMEM
- Αποθήκευση στους -80⁰C με αλουμινόχαρτο
- Παρατήρηση στο φθορίζον μικροσκόπιο

Γ. Αποτελέσματα

Γ.1 Ποσοτικός προσδιορισμός των επιπέδων mRNA των γονιδίων (Atg5, Beclin-1, LC3II) σε φυσιολογικά και οστεοαρθρικά χονδροκύτταρα

Ελέγχθηκαν τα μεταγραφικά επίπεδα των συγκεκριμένων γονιδίων σε χονδροκύτταρα υγιών ανθρώπων και πασχόντων απο οστεοαρθρίτιδα. Στο συγκεκριμένο πείραμα, RNA το οποίο απομονώθηκε απο ολόκληρες φλάσκες καλλιέργειας απο τα αντίστοιχα δείγματα που μελετήθηκαν, χρησιμοποιήθηκε για παραγωγή cDNA το οποίο στην συνέχεια χρησιμοποιήθηκε για να υπολογιστούν τα μεταγραφικά επίπεδα των γονιδίων με PCR πραγματικού χρόνου. Στη συνέχεια, πραγματοποιήθηκε σχετική (όχι απόλυτη) ποσοτικοποίηση των αποτελεσμάτων της PCR, με γονίδιο αναφοράς το GAPDH, με βάση τη μέθοδο $\Delta\Delta CT$. Έπειτα, τα δεδομένα αναλύθηκαν με το στατιστικό πακέτο SPSS 22 και το τεστ Mann Whitney για κάθε γονίδιο χωριστά συγκρίνοντας τα αποτελέσματα απο τα οστεοαρθρικά δείγματα χονδροκυττάρων με αυτά απο τους υγιείς ανθρώπους. Τα αποτελέσματα των μεταγραφικών επιπέδων και για τα τρία γονίδια που ελέγχθηκαν εμφανίστηκαν μειωμένα στην περίπτωση των οστεοαρθρικών χονδροκυττάρων. Η μείωση που παρατηρήθηκε και για τα τρία γονίδια εμφάνισε στατιστική σημαντικότητα με $p\text{-value} < 0,05$.

Γ.1.1 Atg5

Για τον υπολογισμό των μεταγραφικών επιπέδων του Atg5 χρησιμοποιήθηκαν 9 οστεοαρθρικά δείγματα και 9 δείγματα υγιών ανθρώπων. Η τιμή $p\text{-value}$ για την στατιστική σημαντικότητα της διαφοράς των μέσων όρων τους ήταν $p = 0,024 < 0,05$. Τα περιγραφικά στοιχεία και το αποτέλεσμα απο το τεστ Mann Whitney καθώς και το διάγραμμα με την σχηματική απεικόνιση παρατίθενται παρακάτω (**Πίνακας 1, Πίνακας 2, Διάγραμμα 1**).

Πίνακας 1: Στον παρακάτω πίνακα παρουσιάζεται το πλήθος των δειγμάτων (N) που μελετήθηκαν, ο μέσος όρος των τιμών που προκύπτουν από τη μέθοδο $\Delta\Delta CT$ (Mean) και η διακύμανσή τους (Deviation).

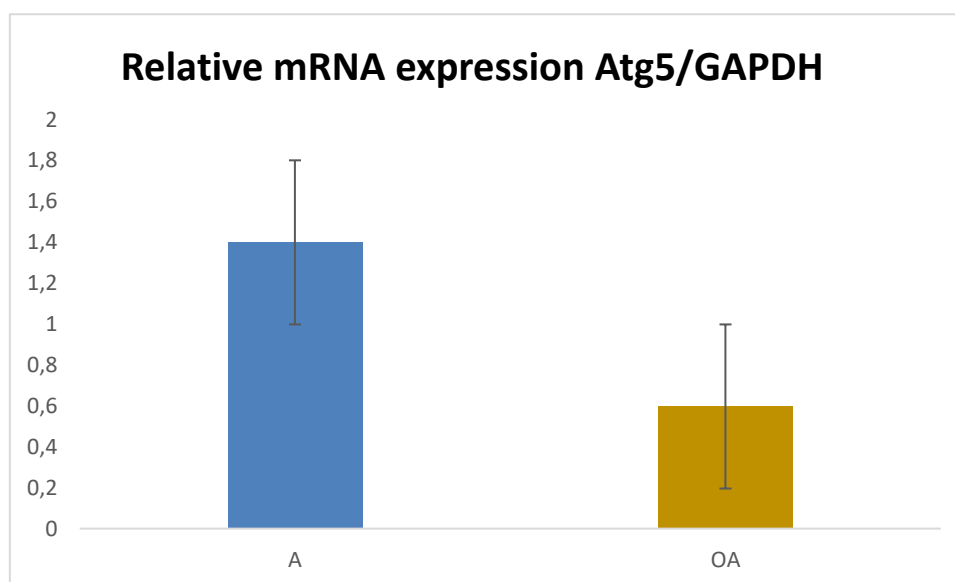
VAR00001	Mean	N	Deviation
A	1,4002	9	,94851
OA	,5973	9	,32358
Total	,9987	18	,80205

Πίνακας 2: Το αποτέλεσμα του τεστ Mann Whitney όπως προκύπτουν από ανάλυση με χρήση του στατιστικού πακέτου SPSS 22.

Hypothesis Test Summary			
Null Hypothesis	Test	Sig.	Decision
1 The distribution of VAR00002 is the same across categories of VAR00001.	Independent-Samples Mann-Whitney U Test	,024 ¹	Reject the null hypothesis.

Asymptotic significances are displayed. The significance level is ,05.

¹Exact significance is displayed for this test.



Διάγραμμα 1: Επίπεδα του Atg5 mRNA, έπειτα από σχετική ποσοτικοποίηση με mRNA αναφοράς την GAPDH (Atg5/GAPDH), μεταξύ υγιών ατόμων (A) και ατόμων που πάσχουν από οστεοαρθρίτιδα (OA).

Γ.1.2 Beclin-1

Για τον υπολογισμό των μεταγραφικών επιπέδων του γονιδίου Beclin-1 χρησιμοποιήθηκαν 10 οστεοαρθρικά δείγματα και 8 δείγματα υγιών ανθρώπων. Η τιμή p value για την στατιστική σημαντικότητα της διαφοράς των μέσων όρων τους ήταν $p=0,021 < 0,05$. Τα περιγραφικά στοιχεία και το αποτέλεσμα απο το τεστ Mann Whitney καθώς και το διάγραμμα με την σχηματική απεικόνιση παρατίθενται παρακάτω (**Πίνακας 3, Πίνακας 4, Διάγραμμα 2**).

Πίνακας 3: Στον παρακάτω πίνακα παρουσιάζεται το πλήθος των δειγμάτων (N) που μελετήθηκαν, ο μέσος όρος των τιμών που προκύπτουν από τη μέθοδο ΔΔCT (Mean) και η διακύμανσή τους (Deviation).

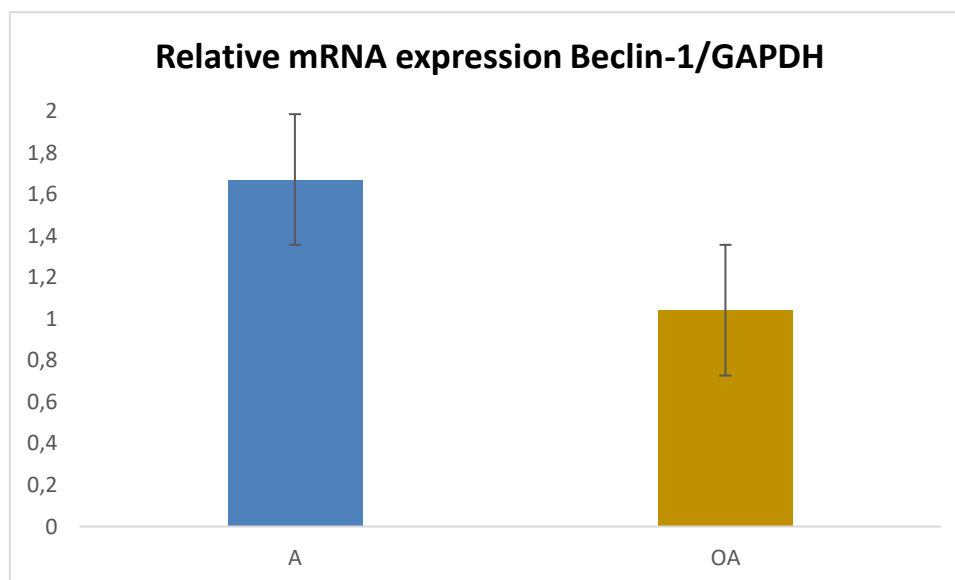
VAR00001	Mean	N	Std. Deviation
A	1,6708	8	,83126
OA	1,0416	10	,61739
Total	1,3212	18	,76801

Πίνακας 4: Το αποτέλεσμα του τεστ Mann Whitney όπως προκύπτουν από ανάλυση με χρήση του στατιστικού πακέτου SPSS 22.

Hypothesis Test Summary			
Null Hypothesis	Test	Sig.	Decision
1 The distribution of VAR00002 is the same across categories of VAR00001.	Independent-Samples Mann-Whitney U Test	,021 ¹	Reject the null hypothesis.

Asymptotic significances are displayed. The significance level is ,05.

¹Exact significance is displayed for this test.



Διάγραμμα 2: Επίπεδα του Beclin-1 mRNA, έπειτα από σχετική ποσοτικοποίηση με mRNA αναφοράς την GAPDH (Beclin-1/GAPDH), μεταξύ υγιών ατόμων (A) και ατόμων που πάσχουν από οστεοαρθρίτιδα (OA).

Γ.1.3 LC3-II

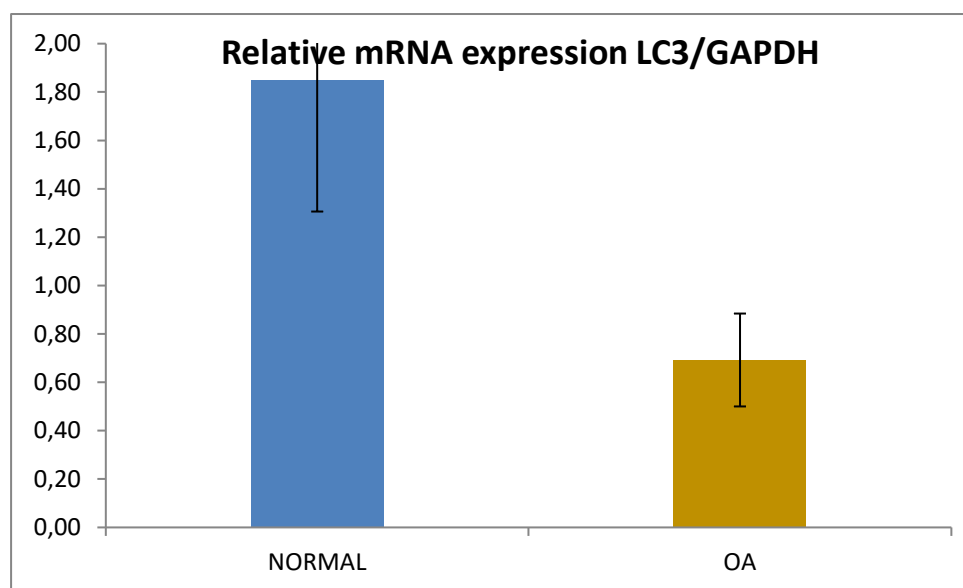
Για τον υπολογισμό των μεταγραφικών επιπέδων του LC3-II χρησιμοποιήθηκαν 14 οστεοαρθρικά δείγματα και 11 δείγματα υγιών ανθρώπων. Η τιμή p value για την στατιστική σημαντικότητα της διαφοράς των μέσων όρων τους ήταν $p=0,037 < 0,05$. Τα περιγραφικά και το αποτέλεσμα από το τεστ Mann Whitney καθώς και το διάγραμμα με την σχηματική αποϊκόνιση παρατίθενται παρακάτω (**Πίνακας 5**, **Πίνακας 6**, **Διάγραμμα 3**).

Πίνακας 5: Στον παρακάτω πίνακα παρουσιάζεται το πλήθος των δειγμάτων (N) που μελετήθηκαν, ο μέσος όρος των τιμών που προκύπτουν από τη μέθοδο ΔΔCT (Mean) και η διακύμανσή τους (Deviation).

groups		N	Mean	Std. Deviation
CT	NORMAL	11	1,848967	1,8010925
	OA	14	,692175	,7184819

Πίνακας 6: Το αποτέλεσμα του τεστ Mann Whitney όπως προκύπτουν από ανάλυση με χρήση του στατιστικού πακέτου SPSS 22.

Test Statistics ^a	
	CT
Mann-Whitney U	39,000
Wilcoxon W	144,000
Z	-2,080
Asymp. Sig. (2-tailed)	,037
Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	,038 ^b
a. Grouping Variable:	
b. Not corrected for	



Διάγραμμα 3: Επίπεδα του LC3-II mRNA, έπειτα από σχετική ποσοτικοποίηση με mRNA αναφοράς την GAPDH (LC3-II/GAPDH), μεταξύ υγιών ατόμων (A) και ατόμων που πάσχουν από οστεοαρθρίτιδα (OA).

Γ.2 Ποσοτικός προσδιορισμός των επιπέδων mRNA των γονιδίων (Atg5, Beclin-1, LC3II) σε φυσιολογικά και οστεοαρθριτικά χονδροκύτταρα έπειτα απο επίδραση με οξειδωτικό στρες (H₂O₂)

Ελέγχθηκαν τα μεταγραφικά επίπεδα των συγκεκριμένων γονιδίων σε χονδροκύτταρα υγιών ανθρώπων και πασχόντων απο οστεοαρθρίτιδα έπειτα απο επίδραση με οξειδωτικό στρες (H₂O₂). Στο συγκεκριμένο πείραμα, RNA το οποίο απομονώθηκε απο πηγάδια sixwells απο τα αντίστοιχα δείγματα που μελετήθηκαν κάθε φορά χρησιμοποιήθηκε για παραγωγή cDNA και στην συνέχεια το cDNA χρησιμοποιήθηκε για να υπολογιστούν τα μεταγραφικά επίπεδα των γονιδίων με real-time PCR. Το κάθε δείγμα στο οποίο πραγματοποιήθηκαν επιδράσεις μοιράστηκε σε 4 διαφορετικά πηγάδια (χωρίς επίδραση H₂O₂, 1, 6 και 24 ώρες ανάκαμψης). Η ποσοτικοποίηση που πραγματοποιήθηκε ήταν σχετική και όχι απόλυτη με γονίδιο αναφοράς το GAPDH με την μέθοδο ΔΔCT. Στην συνέχεια τα μεταγραφικά επίπεδα των συγκεκριμένων γονιδίων μετά από κάθε ώρα ανάκαμψης για το κάθε δείγμα συγκρίθηκαν με τα αντίστοιχα χωρίς την επίδραση. Σκοπός του συγκεκριμένου πειράματος είναι να παρατηρήσουμε την επίδραση που είχε το οξειδωτικό στρες στα μεταγραφικά επίπεδα

για κάθε γονίδιο ανάλογα με την ώρα ανάκαμψης, για κάθε δείγμα χωριστά. Τέλος τα δείγματα ομαδοποιήθηκαν σε οστεοαρθρικά και φυσιολογικά ώστε να παρατηρήσουμε αν το οξειδωτικό στρές προκαλεί διαφορετική απόκριση των μεταγραφικών επιπέδων των γονιδίων που σχετίζονται με την αυτοφαγία ανάμεσα στις δύο ομάδες. Χρησιμοποιήθηκαν 3 οστεοαρθρικά και 1 φυσιολογικό δείγμα (**Πίνακας 8**) στα οποία έγιναν οι παραπάνω επιδράσεις. Τα οστεοαρθρικά ομαδοποιήθηκαν και υπολογίστηκαν οι μέσοι όροι για κάθε γονίδιο για κάθε διαφορετικό χρόνο ανάκαμψης αν και όπως μπορούμε να παρατηρήσουμε και στον **Πίνακα 7** δεν είχαν ουσιαστικά διαφορές μεταξύ τους.

Πίνακας 7: Στον παρακάτω πίνακα παρουσιάζονται οι τιμές από τα $2^{-\Delta\Delta CT}$ για κάθε γονίδιο, για κάθε δείγμα ΟΑ χωριστά καθώς και οι μέσοι όροι τους.

	ATG5	Beclin-1	LC3-II
7310A NT	1	1	1
7310A 1H	0.55478474	0.47963206	1.515717
7310A 6H	0.63728031	0.52485834	0.876606
7310A 24H	0.92658806	0.9794203	1.231144
7270A NT	1	1	1
7270A 1H	1.12505848	1.17283495	1.905276
7270A 6H	0.952638	0.9930925	1.132884
7270A 24H	1.55832916	1.11728714	2.099433
7300A NT	1	1	1
7300A 1H	0.69255473	0.64617642	1.827663
7300A 6H	0.71697762	0.64171295	1.94531
7300A 24H	1.37554182	1.15668818	1.777685
M.O NT	1	1	1
M.O 1H	0.75262337	0.7120251	1.741101
M.O 6H	0.75785828	0.69255473	1.248331
M.O 24H	1.25701337	1.07922824	1.658639

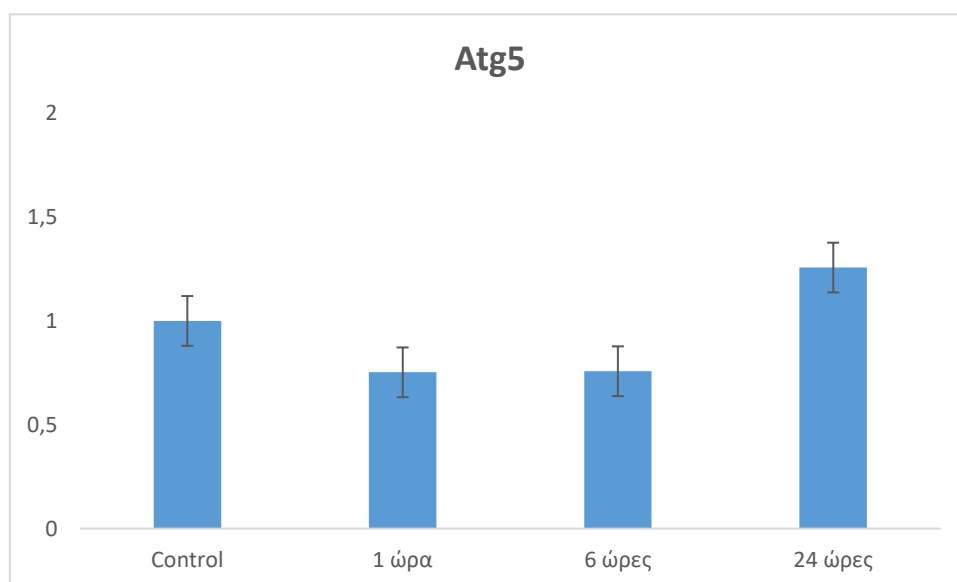
Πίνακας 8: Στον παρακάτω πίνακα παρουσιάζονται οι τιμές από τα $2^{-\Delta\Delta CT}$ για κάθε γονίδιο, για το φυσιολογικό δείγμα (Α).

	ATG5	Beclin-1	LC3-II
202A NT	1	1	1
202A 1H	1.2483305	0.8066418	1.404445
202A 6H	1.5052467	0.7219646	0.473029
202A 24H	1.1019051	0.6551967	0.48971

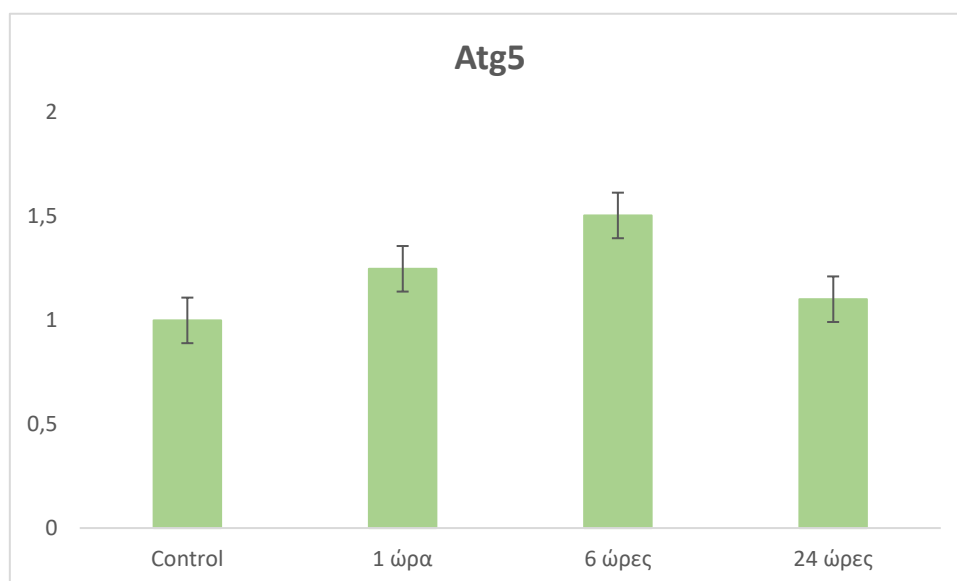
Γ.2.1 Atg5

Στον μέσο όρο των μεταγραφικών επιπέδων του γονιδίου Atg5 από τα 3 οστεοαρθρικά δείγματα παρατηρείται μείωση έπειτα από την επίδραση οξειδωτικού στρες και την ανάκαμψη για μία ώρα και τρεις ώρες ενώ αντίθετα μια μικρή αύξηση έπειτα από 24 ώρες ανάκαμψης (**Διάγραμμα 4**).

Τα αντίστοιχα μεταγραφικά επίπεδα του γονιδίου Atg5 από το δείγμα υγιούς ανθρώπου εντοπίστηκαν αυξημένα έπειτα από την επίδραση και για τις τρεις διαφορετικές ώρες ανάκαμψης αν και κατά τις 24 ώρες ανάκαμψης παρουσίασαν την μικρότερη αύξηση, σχεδόν παρόμοια επίπεδα με το μάρτυρα (χωρίς επίδραση) (**Διάγραμμα 5**).



Διάγραμμα 4: Μέσοι όροι των επιπέδων του γονιδίου Atg5 mRNA των τριών οστεοαρθρικών δειγμάτων, έπειτα από σχετική ποσοτικοποίηση με mRNA αναφοράς την GAPDH (Atg5/GAPDH), επίδραση με οξειδωτικό στρες και ανάκαμψη στις αντίστοιχες ώρες.

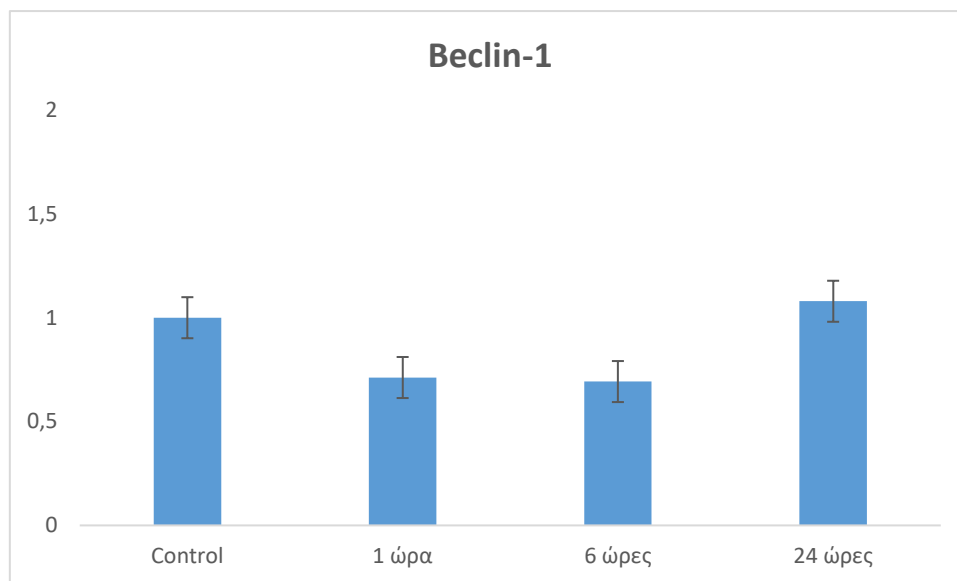


Διάγραμμα 5: Μέσοι όροι των επιπέδων του γονιδίου Atg5 mRNA του φυσιολογικού δείγματος, έπειτα από σχετική ποσοτικοποίηση με mRNA αναφοράς την GAPDH (Atg5/GAPDH), επίδραση με οξειδωτικό στρες και ανάκαμψη στις αντίστοιχες ώρες.

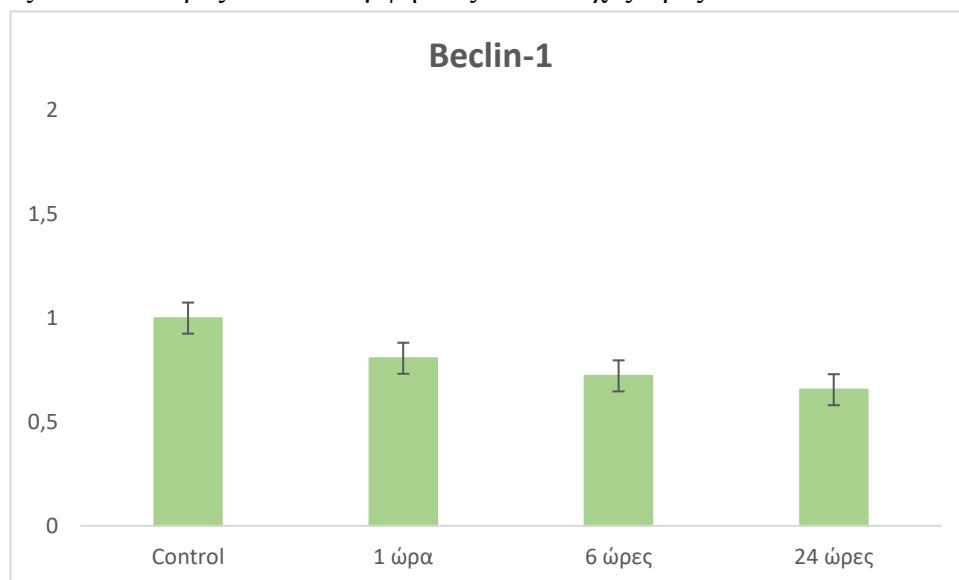
Γ.2.2 Beclin-1

Στον μέσο όρο των μεταγραφικών επιπέδων του γονιδίου Beclin-1 από τα 3 οστεοαρθρικά δείγματα παρατηρείται μείωση έπειτα από την επίδραση οξειδωτικού στρες και την ανάκαμψη για μία ώρα και τρεις ώρες ενώ έπειτα από 24 ώρες ανάκαμψης τα επίπεδα είναι αντίστοιχα με τα φυσιολογικά του μάρτυρα (**Διάγραμμα 6**).

Τα αντίστοιχα μεταγραφικά επίπεδα του γονιδίου Beclin-1 από το δείγμα υγιούς ανθρώπου εντοπίστηκαν μειωμένα έπειτα από την επίδραση και για τις τρεις διαφορετικές ώρες ανάκαμψης με τα μικρότερα επίπεδα να εμφανίζονται μετά από τις 24 ώρες ανάκαμψης (**Διάγραμμα 7**).



Διάγραμμα 6: Μέσοι όροι των επιπέδων του γονιδίου Beclin-1 mRNA των τριών οστεοαρθρικών δειγμάτων, έπειτα από σχετική ποσοτικοποίηση με mRNA αναφοράς την GAPDH (Beclin-1/GAPDH), επίδραση με οξειδωτικό στρες και ανάκαμψη στις αντίστοιχες ώρες.

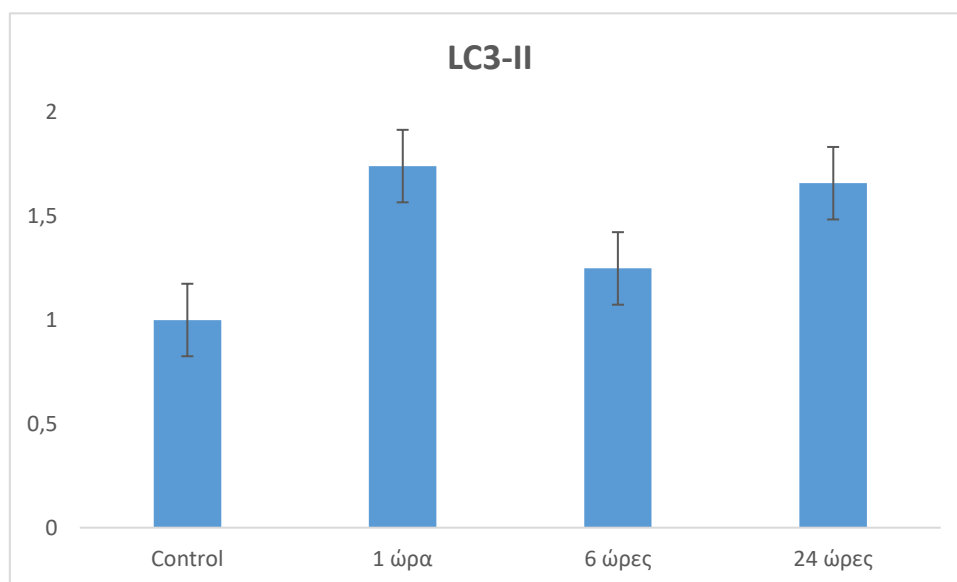


Διάγραμμα 7: Μέσοι όροι των επιπέδων του γονιδίου Beclin-1 mRNA του φυσιολογικού δείγματος, έπειτα από σχετική ποσοτικοποίηση με mRNA αναφοράς την GAPDH (Beclin-1/GAPDH), επίδραση με οξειδωτικό στρες και ανάκαμψη στις αντίστοιχες ώρες.

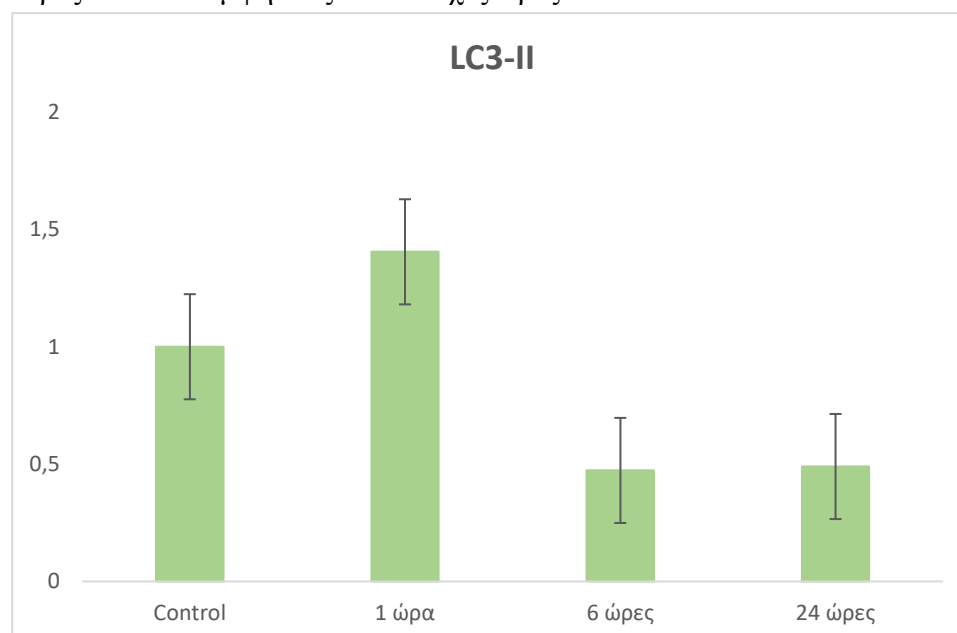
Γ.2.3 LC3-II

Στον μέσο όρο των μεταγραφικών επιπέδων του γονιδίου LC3-II απο τα 3 οστεοαρθρικά δείγματα παρατηρείται αύξηση έπειτα απο την επίδραση οξειδωτικού στρες και για τις τρεις διαφορετικές ώρες ανάκαμψης (**Διάγραμμα 8**).

Τα αντίστοιχα μεταγραφικά επίπεδα του γονιδίου LC3-II απο το δείγμα υγιούς ανθρώπου εντοπίστηκαν μειωμένα έπειτα απο την επίδραση οξειδωτικού στρες και την ανάκαμψη για τρεις ώρες και 24 ώρες ενώ αντίθετα παρατηρήθηκε αύξηση μετά απο μία ώρα ανάκαμψης (**Διάγραμμα 9**).



Διάγραμμα 8: Μέσοι όροι των επιπέδων του γονιδίου LC3-II mRNA των τριών οστεοαρθρικών δειγμάτων, έπειτα από σχετική ποσοτικοποίηση με mRNA αναφοράς την GAPDH (LC3-II/GAPDH), επίδραση με οξειδωτικό στρες και ανάκαμψη στις αντίστοιχες ώρες.



Διάγραμμα 9: Μέσοι όροι των επιπέδων του γονιδίου LC3-II mRNA του φυσιολογικού δείγματος, έπειτα από σχετική ποσοτικοποίηση με mRNA αναφοράς την GAPDH (LC3-II/GAPDH), επίδραση με οξειδωτικό στρες και ανάκαμψη στις αντίστοιχες ώρες.

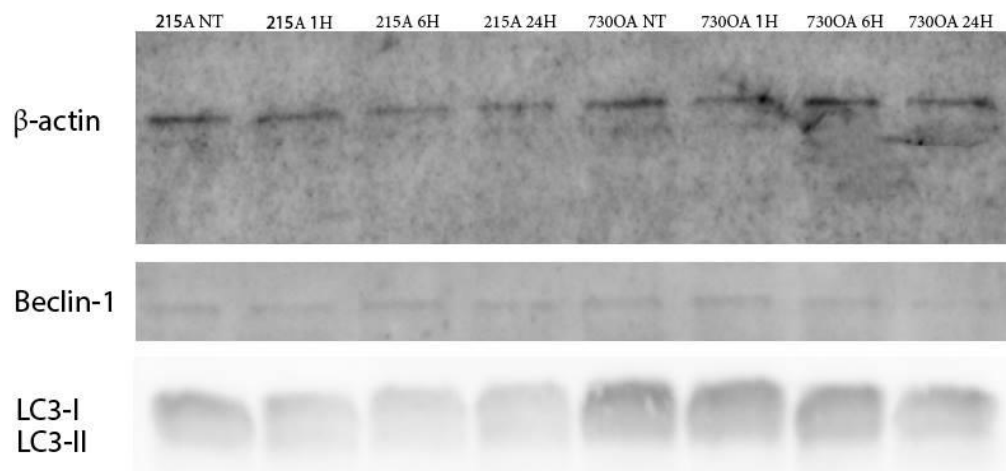
Γ.3 Ποσοτικός προσδιορισμός των πρωτεϊνικών επιπέδων των γονιδίων (Beclin-1, LC3A/B) σε φυσιολογικά και οστεοαρθριτικά χονδροκύτταρα έπειτα απο επίδραση με οξειδωτικό στρες (H₂O₂)

Ελέγχθηκαν τα πρωτεϊνικά επίπεδα των συγκεκριμένων γονιδίων σε χονδροκύτταρα υγιών ανθρώπων και πασχόντων απο οστεοαρθρίτιδα έπειτα απο επίδραση με οξειδωτικό στρες (H₂O₂). Στο συγκεκριμένο πείραμα καλλιεργήσαμε χονδροκύτταρα από το κάθε δείγμα που μελετήθηκε. Τα δείγματα στα οποία πραγματοποιήθηκαν επιδράσεις μοιράστηκαν σε 4 διαφορετικά πηγάδια σε 6-well plates (χωρίς επίδραση H₂O₂, 1, 6 και 24 ώρες ανάκαμψης) και έπειτα απο την επίδραση με το υπεροξείδιο (1 ώρα) και τις ανακάμψεις (1 ώρα, 6 ώρες, 24 ώρες), ακολουθήθηκε λύση των κυττάρων και απομόνωση των πρωτεϊνών τους, προσδιορισμός της συνολικής συγκέντρωσης πρωτεΐνης και ποσοτικός προσδιορισμός των (Beclin-1 και LC3A/B). Η ποσοτικοποίηση που πραγματοποιήθηκε ήταν σχετική και όχι απόλυτη με γονίδιο αναφοράς τη β-actin. Στην συνέχεια τα πρωτεϊνικά επίπεδα των συγκεκριμένων γονιδίων μετά από κάθε ώρα ανάκαμψης για το κάθε δείγμα συγκρίθηκαν με τα αντίστοιχα χωρίς την επίδραση. Σκοπός του συγκεκριμένου πειράματος είναι να παρατηρήσουμε την επίδραση που είχε το οξειδωτικό στρες στα μεταγραφικά επίπεδα για κάθε γονίδιο ανάλογα με την ώρα ανάκαμψης, για κάθε δείγμα χωριστά. Τέλος τα δείγματα ομαδοποιήθηκαν σε οστεοαρθριτικά και φυσιολογικά ώστε να παρατηρήσουμε αν το οξειδωτικό στρες προκαλεί διαφορετική απόκριση των πρωτεϊνικών επιπέδων των γονιδίων που σχετίζονται με την αυτοφαγία ανάμεσα στις δύο ομάδες. Χρησιμοποιήθηκαν 2 οστεοαρθριτικά και 2 φυσιολογικά δείγματα στα οποία έγιναν οι παραπάνω επιδράσεις. Στην συνέχεια ομαδοποιήθηκαν και υπολογίστηκαν οι μέσοι όροι για κάθε γονίδιο για κάθε διαφορετικό χρόνο ανάκαμψης.

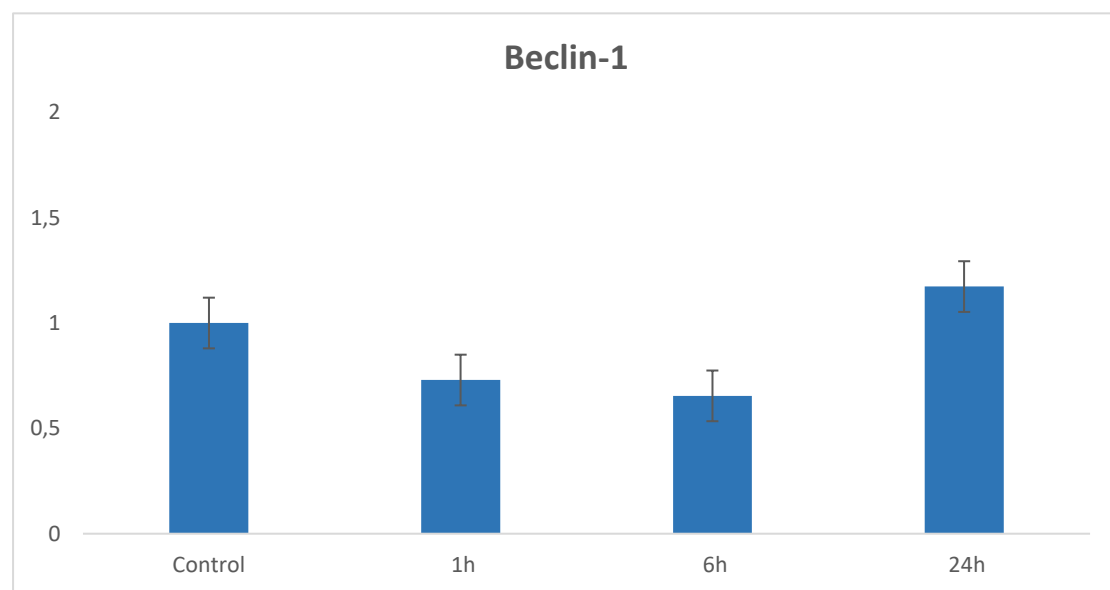
Γ.3.2 Beclin-1

Στον μέσο όρο των μεταγραφικών επιπέδων του γονιδίου Beclin-1 απο το 1 οστεοαρθριτικό δείγμα παρατηρείται μείωση έπειτα απο την επίδραση οξειδωτικού στρες και την ανάκαμψη για μία ώρα και τρεις ώρες ενώ έπειτα απο 24 ώρες ανάκαμψης τα επίπεδα είναι αντίστοιχα με τα φυσιολογικά του μάρτυρα (**Διάγραμμα 10, Εικόνα 8**).

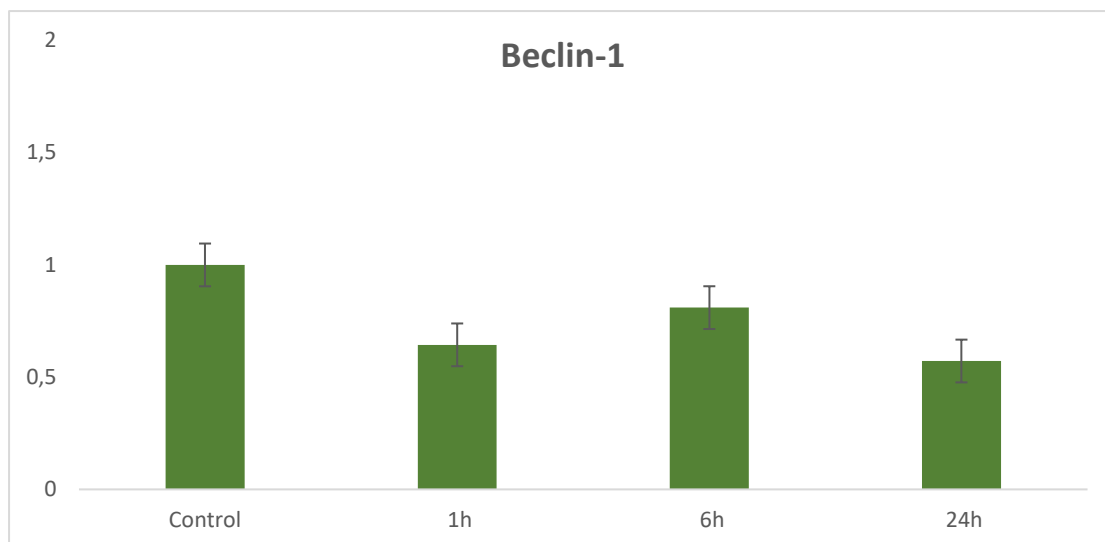
Τα αντίστοιχα μεταγραφικά επίπεδα του γονιδίου Beclin-1 από το 1 δείγμα υγιούς ανθρώπου εντοπίστηκαν μειωμένα έπειτα από την επίδραση και για τις τρεις διαφορετικές ώρες ανάκαμψης (**Διάγραμμα 11, Εικόνα 8**).



Εικόνα 8: Έκφραση της Beclin-1, LC3-I και LC3-II (Western blot) (εικόνα από το λογισμικό UVITEC alliance).



Διάγραμμα 10: Μέσοι όροι των πρωτεϊνικών επιπέδων του γονιδίου Beclin-1 του ενός οστεοαρθρικού δείγματος, έπειτα από σχετική ποσοτικοποίηση μέσω της β-actin (Beclin-1/β-actin), επίδραση με οξειδωτικό στρες και ανάκαμψη στις αντίστοιχες ώρες.

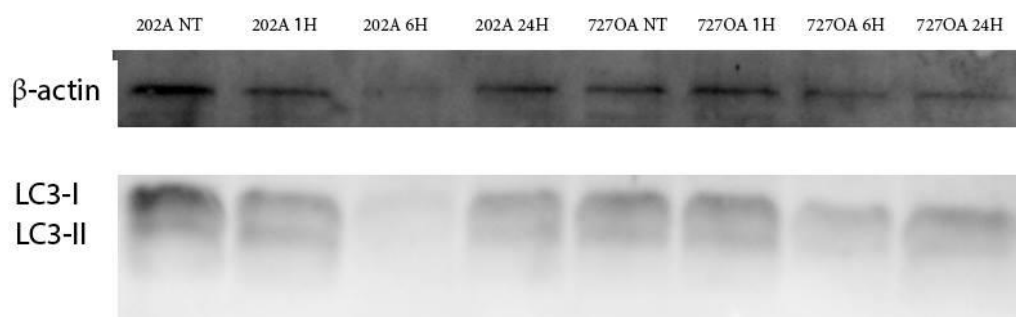


Διάγραμμα 11: Μέσοι όροι των πρωτεϊνικών επιπέδων του γονιδίου Beclin-1 του υγιούς δείγματος, έπειτα από σχετική ποσοτικοποίηση μέσω της β-actin (Beclin-1/β-actin), επίδραση με οξειδωτικό στρες και ανάκαμψη στις αντίστοιχες ώρες.

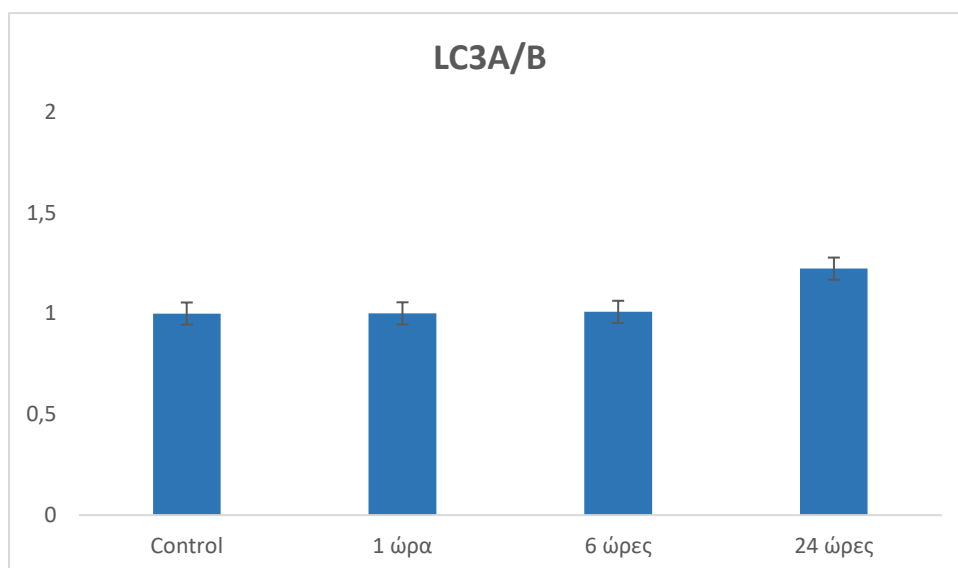
Γ.3.3 LC3A/B

Στον μέσο όρο των πρωτεϊνικών επιπέδων των γονιδίων LC3-II και LC3-I μαζί, απο τα δύο οστεοαρθρικά δείγματα δεν παρατηρείται κάποια αλλαγή έπειτα απο την επίδραση οξειδωτικού στρες και ανάκαμψη για 1 ώρα και 6 ώρες αλλά παρατηρήθηκε αύξηση έπειτα απο 24 ώρες. (**Διάγραμμα 12, Εικόνα 8, Εικόνα 9**).

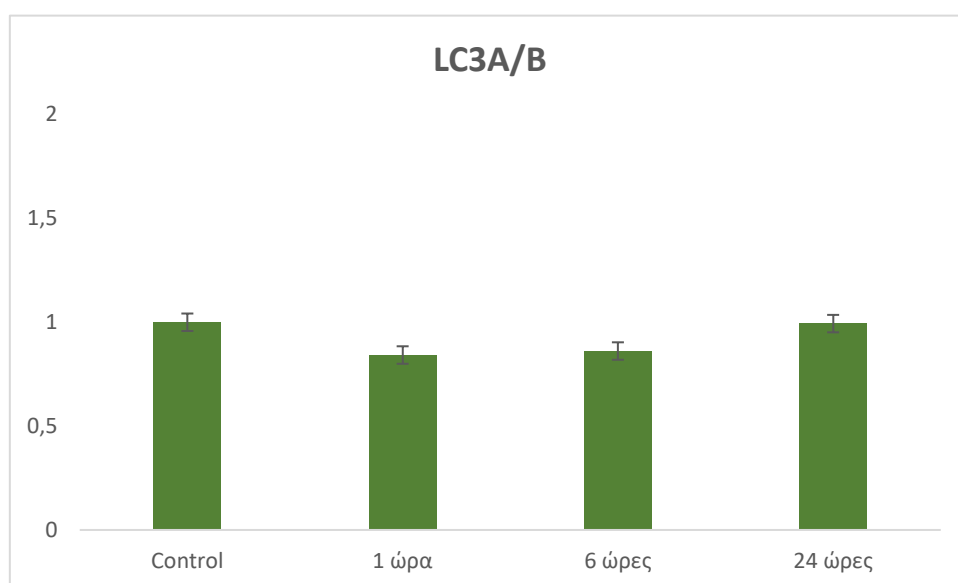
Τα αντίστοιχα πρωτεϊνικά επίπεδα του γονιδίου LC3-II και LC3-I μαζί, απο τα δύο δείγματα υγιών ανθρώπων εντοπίστηκαν μειωμένα έπειτα απο την επίδραση οξειδωτικού στρες και την ανάκαμψη για 1 ώρα και 6 ώρες ενώ έπειτα απο 24 ώρες τα επίπεδα ήταν λίγο κάτω τον φυσιολογικών. (**Διάγραμμα 13, Εικόνα 8, Εικόνα 9**).



Εικόνα 9: Έκφραση της LC3-I και LC3-II (Western blot) (εικόνα απο το λογισμικό UVITEC alliance).



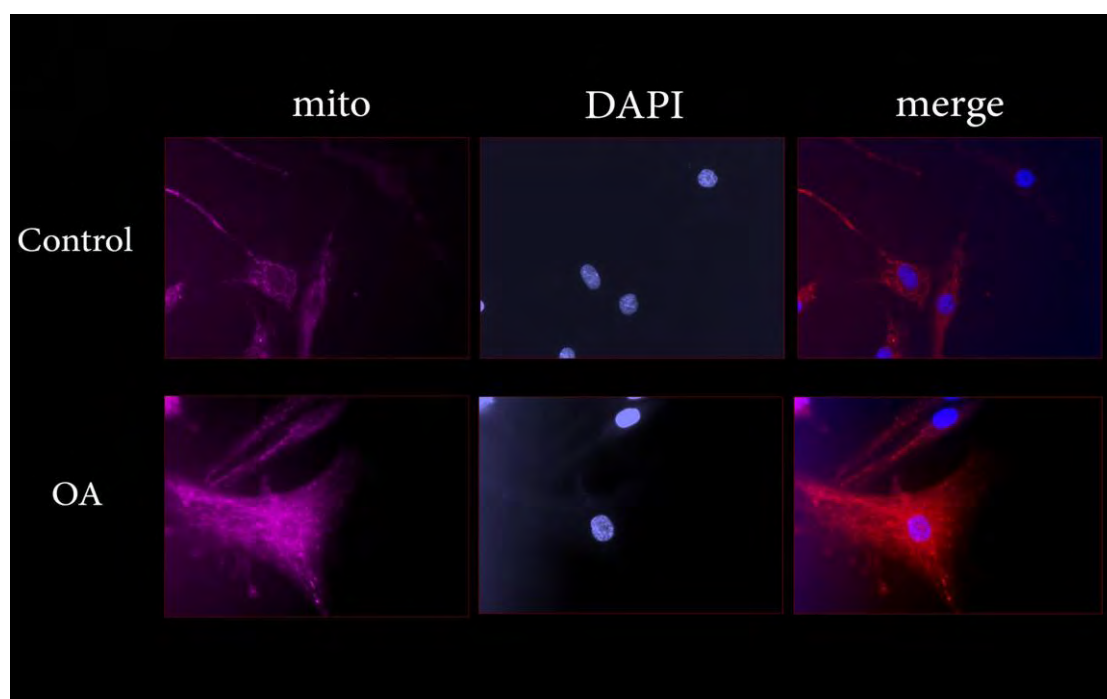
Διάγραμμα 12: Μέσοι όροι των πρωτεϊνικών επιπέδων των γονιδίων LC3A/B των δύο οστεοαρθριτικών δειγμάτων, έπειτα από σχετική ποσοτικοποίηση μέσω της β -actin (LC3A/B / β -actin), επίδραση με οξειδωτικό στρες και ανάκαμψη στις αντίστοιχες ώρες.



Διάγραμμα 13: Μέσοι όροι των πρωτεϊνικών επιπέδων των γονιδίων LC3A/B των δύο υγιών δειγμάτων, έπειτα από σχετική ποσοτικοποίηση μέσω της β -actin (LC3A/B/ β -actin), επίδραση με οξειδωτικό στρες και ανάκαμψη στις αντίστοιχες ώρες.

Γ.4 Έλεγχος της μορφολογίας των μιτοχονδρίων σε φυσιολογικά και οστεοαρθρικά χονδροκύτταρα

Προκειμένου να παρατηρήσουμε την μορφολογία των μιτοχονδρίων πραγματοποιήσαμε χρώση σε ζώντα κύτταρα με ειδικούς ανιχνευτές που βάφουν μόνο τα μιτοχόνδρια. Η συγκεκριμένη διαδικασία πραγματοποιήθηκε προκειμένου να παρατηρήσουμε αν υπάρχουν μορφολογικές αλλαγές στα μιτοχόνδρια ανάμεσα στα οστεοαρθρικά και στα φυσιολογικά χονδροκύτταρα, λόγω του χρόνιου οξειδωτικού στρες, και της ελαττωματικής αυτοφαγίας που υποβάλλονται τα οστεοαρθρικά. Ακολούθησε χρώση των κυττάρων με DAPI, χρωστική που σημαίνει με μπλε χρώμα τη χρωματίνη (πυρήνας). Τα μιτοχόνδρια που παρατηρήθηκαν χωρίστηκαν σε δύο κατηγορίες αντί για τέσσερις. Τα μιτοχόνδρια με τις ακόλουθες μορφές (στίγματα, ράβδοι, δικτυωμένα) ομαδοποιήθηκαν σε μία ομάδα αυτή των φυσιολογικών μορφολογικά μιτοχονδρίων ενώ τα μεγάλα κυκλικά παθολογικά μιτοχόνδρια αποτελούσαν την δεύτερη ομάδα. Τα οστεοαρθρικά χονδροκύτταρα εμφάνιζαν σε μεγάλο βαθμό μεγάλα κυκλικά παθολογικά μιτοχόνδρια ενώ κάτι αντίστοιχο σχεδόν δεν παρουσιάστηκε στα φυσιολογικά χονδροκύτταρα στα οποία παρατηρήθηκαν δικτυωμένα ως επί το πλείστον (**Εικόνα 10**).



Εικόνα 10: Φυσιολογικά και οστεοαρθρικά χονδροκύτταρα έπειτα απο χρώση των μιτοχονδρίων τους καθώς και των πυρήνων τους με DAPI.

Δ. Συζήτηση

Η οστεοαρθρίτιδα είναι μια εκφυλιστική νόσος η οποία συνιστά την πιο κοινή μορφή πάθησης των αρθρώσεων. Η ΟΑ συχνά περιγράφεται ως μια κατάσταση χρόνιου οξειδωτικού στρες, καθώς η παραγωγή ελεύθερων ριζών υπερβαίνει την αντι-οξειδωτική ικανότητα του οργανισμού πριν ακόμη εμφανιστούν τα πρώτα συμπτώματα της νόσου. Διαταραχές στην ισορροπία υπέρ της παραγωγής των ROS μπορούν να οδηγήσουν σε τοξικά αποτελέσματα στον οργανισμό καθώς οι ROS μπορούν να δημιουργήσουν πρόβλημα σε όλα τα συστατικά των κυττάρων. Έτσι η εμφάνιση και η επιδείνωση της οστεοαρθρίτιδας έχει συσχετιστεί άμεσα με την παραγωγή των ROS καθώς διαταράσσουν την ομοιοστασία ολόκληρης της άρθρωσης ^{71 72}. Η αυτοφαγία αποτελεί έναν απαραίτητο κυτταρικό ομοιοστατικό μηχανισμό για την απομάκρυνση δυσλειτουργικών μακρομορίων και κυτταρικών οργανιδίων ⁸². Πολλές έρευνες υποστηρίζουν τον προστατευτικό της ρόλο στην εμφάνιση ΟΑ ^{133 105} καθώς και την ύπαρξη σχέσης μεταξύ της αυτοφαγίας και οξειδωτικού στρες. Επιπλέον παύση αυτοφαγίας έχει βρεθεί ότι οδηγεί σε αύξηση των ROS καθώς και μιτοχονδριακή δυσλειτουργία ¹²⁶. Με δεδομένη της σύνδεση του οξειδωτικού στρες και της αυτοφαγίας με την ΟΑ καθώς και της αυτοφαγίας με το οξειδωτικό στρες και την μιτοχονδριακή δυσλειτουργία αλλά και της μιτοχονδριακής δυσλειτουργίας με την παραγωγή ROS, σκοπός της παρούσας μελέτης ήταν η διερεύνηση της επίδρασης του οξειδωτικού στρες στην ρύθμιση γονιδίων που σχετίζονται με την οστεοαρθρίτιδα. Τα γονίδια που αποτέλεσαν αντικείμενο μελέτης της συγκεκριμένης διπλωματικής εργασίας ήταν τα: Atg5, LC3-II, και Beclin-1.

Αρχικά θέλαμε να συγκρίνουμε τα μεταγραφικά επίπεδα των γονιδίων σε φυσιολογικά χονδροκύτταρα σε σχέση με χονδροκύτταρα που απομονώθηκαν από ασθενείς με οστεοαρθρίτιδα από περιοχές του χόνδρου που είχαν αποδομηθεί σε μεγάλο βαθμό. Το πρότυπο που παρατηρήθηκε ήταν κοινό ανάμεσα στα τρία γονίδια καθώς υπάρχει μια ορατή και στατιστικά σημαντική μείωση των μεταγραφικών επιπέδων τους στα οστεοαρθρικά δείγματα. Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι τα παθολογικά χονδροκύτταρα εμφανίζουν πολύ χαμηλότερα μεταγραφικά επίπεδα των αυτοφαγικών γονιδίων κάτι που συμφωνεί και με προγενέστερες μελέτες ^{109 134 135}, επιβεβαιώνοντας έτσι τα αποτελέσματά τους. Οι περιοχές από όπου απομονώθηκαν τα χονδροκύτταρα (ΟΑ τελικών σταδίων αποδόμησης) αποτελεί σημαντικό στοιχείο που πρέπει να αναφερθεί καθώς άλλες μελέτες έχουν δείξει ότι τα μεταγραφικά επίπεδα των

αυτοφαγικών γονιδίων αυξάνονται στα αρχικά στάδια της ΟΑ προσπαθώντας να λειτουργίσουν ως προστατευτικός μηχανισμός¹³³ αλλά στην συνέχεια μειώνονται όταν δεν ανταπεξέρθουν στις βλάβες.

Στην προσπάθειά μας να διερευνήσουμε την απόκριση των μεταγραφικών επιπέδων των αυτοφαγικών γονιδίων που μελετήθηκαν στο οξειδωτικό στρες τόσο σε οστεοαρθρικά όσο και σε φυσιολογικά χονδροκύτταρα, επιδράσαμε με υπεροξείδιο του υδρογόνου (H_2O_2) για μία ώρα και στην συνέχεια αφήσαμε να ανακάμψουν για 1 ώρα, 6 ώρες και 24 ώρες. Πραγματοποιήθηκε σύγκριση των επιπέδων του κάθε δείγματος με το μάρτυρα (χωρίς επίδραση) ώστε να δούμε αν τα φυσιολογικά χονδροκύτταρα αποκρίνονται διαφορετικά σε σχέση με τα οστεοαρθρικά ως προς τα επίπεδα των αυτοφαγικών τους γονιδίων έπειτα από επίδραση με οξειδωτικό στρες καθώς και ανάκαμψης στις διάφορες ώρες. Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι δεν υπάρχει ένα σταθερό πρότυπο για όλα τα γονίδια που μελετήθηκαν (Atg5, LC3-II, και Beclin-1) σε κάθε ομάδα (ΟΑ-φυσιολογικά) στην απόκρισή τους έπειτα από έκθεσή τους στο H_2O_2 . Ο λόγος που δεν υπάρχει σταθερό πρότυπο ανάμεσα στα γονίδια πιθανώς να σχετίζεται με το στάδιο και την λειτουργία στην οποία συμμετέχει το κάθε γονίδιο μέχρι τελικά την επαγωγή ή μη της αυτοφαγίας. Οι διαφορές αντίθετα ανάμεσα στα φυσιολογικά και οστεοαρθρικά κύτταρα πιθανόν οφείλονται στην διαφορετική ικανότητα απόκρισης στο οξειδωτικό στρες μέσω της αυτοφαγίας. Προσπαθώντας να ομαδοποιήσουμε τις παρατηρήσεις μπορούμε να σχολιάσουμε ότι τα επίπεδα στο φυσιολογικό δείγμα μειώνονται για τα δύο γονίδια (LC3-II, Beclin-1) (εξαιρέση αποτελεί η μία ώρα στο LC3-II που παρατηρείται αύξηση) έπειτα από επίδραση ενώ για το Atg5 αυξάνονται. Τα αντίστοιχα επίπεδα για τα οστεοαρθρικά δείγματα στο LC3-II αντίθετα με το φυσιολογικό αυξάνονται ενώ παρατηρείται ένα κοινό πρότυπο στο (Beclin-1, Atg5) όπου μια αρχική μείωση στην μία ώρα και στις έξι ώρες διαδέχεται μια αύξηση με επίπεδα λίγο πάνω από τα φυσιολογικά για τα οστεοαρθρικά δείγματα στις 24 ώρες. Βλέποντας αυτές τις διαφορές στα μεταγραφικά επίπεδα θελήσαμε να ελέγξουμε και τα πρωτεϊνικά επίπεδα. Στα πρωτεϊνικά επίπεδα ελέγχθηκαν τα γονίδια Beclin-1, και LC3-I/LC3-II ως σύνολο έκφρασης των επιπέδων του LC3. Στο Beclin-1 παρατηρήθηκαν παρόμοιες αποκρίσεις όπως και στα μεταγραφικά επίπεδα ενώ στο LC3 παρατηρήθηκαν κάποιες διαφοροποιήσεις σε σχέση με την απόκριση στα επίπεδα του mRNA του. Τα πρωτεϊνικά επίπεδα του LC3 στα οστεοαρθρικά χονδροκύτταρα βλέπουμε να

παραμένουν λίγο πάνω απο τα φυσιολογικά τους, και στην συνέχεια να αυξάνονται στις 24 ώρες ενώ στα μεταγραφικά έχουμε άύξηση σε όλες τις ώρες. Όσον αφορά τα φυσιολογικά χονδροκύτταρα στα μεταγραφικά επίπεδα εντοπίζεται αύξηση στην μία ώρα μετά την επίδραση ενώ στα πρωτεϊνικά βλέπουμε μια εμφανή μείωση όπως και στις υπόλοιπες ώρες που παρατηρείται και στα μεταγραφικά και στα πρωτεϊνικά επίπεδα. Τα αποτελέσματα μας συμφωνούν και με αυτά των ¹³⁶ που εντόπισαν μείωση των πρωτεϊνικών επιπέδων του LC3 έπειτα απο επίδραση με υπεροξείδιο του υδρογόνου (H_2O_2) στην κυτταρική σειρά C-28/I2 χονδροκυττάρων, που χρησιμοποιείται ευρέως αντί των πρωτογενών φυσιολογικών χονδροκυττάρων. Η διαφορά στην μία ώρα μπορεί να οφείλεται σε διαφορετικό τρόπο απόκρισης του μηχανισμού όσον αφορά τα πρωτεϊνικά σε σχέση με τα μεταγραφικά επίπεδα που δεν είναι γνωστός προς το παρόν ή να οφείλεται σε τυχαίες διακυμάνσεις λόγω διαφορετικών δειγμάτων και περιορισμένο αριθμού τους. Η μελέτη της επίδρασης του οξειδωτικού στρες σε χονδροκύτταρα απομονωμένα απο ασθενείς με ΟΑ και υγιείς δότες (μάρτυρες) για έλεγχο των αυτοφαγικών γονιδίων και των πρωτεϊνικών επιπέδων τους αποτελεί μια πρωτότυπη ιδέα, καθώς αντίστοιχα αποτελέσματα δεν υπάρχουν στην υπάρχουσα βιβλιογραφία. Συνεπώς, ενώ δεν μπορούμε λόγω περιορισμένου αριθμού δειγμάτων (3ΟΑ-1φυσιολογικό στα μεταγραφικά επίπεδα) (2ΟΑ-2φυσιολογικά στα πρωτεϊνικά επίπεδα) να καταλήξουμε σε απόλυτα ασφαλή συμπεράσματα για την ακριβή απόκριση των εκάστοτε γονιδίων ανάμεσα στις δύο ομάδες, μπορούμε να σημειώσουμε το ενδιαφέρον γενικό συμπέρασμα στο οποίο καταλήξαμε: Ανάμεσα στις δύο ομάδες χονδροκυττάρων (φυσιολογικών και ΟΑ) έχουμε διαφορετικές αποκρίσεις στα υπό μελέτη αυτοφαγικά γονίδια έπειτα απο την επίδραση του οξειδωτικού στρες. Το συμπέρασμα αυτό μαζί με το γεγονός ότι τα οστεοαρθρικά χονδροκύτταρα έχουν ήδη μειωμένα μεταγραφικά επίπεδα των αυτοφαγικών γονιδίων τους, αποτελεί ισχυρή ένδειξη ότι η διαδικασία την αυτοφαγίας καθώς και η ρύθμισή της μέσω του οξειδωτικού στρες στα ΟΑ χονδροκύτταρα είναι ελαττωματική και διαφορετική σε σχέση με τα φυσιολογικά.

Τέλος γνωρίζοντας ότι το οξειδωτικό στρες (που εμφανίζεται στην ΟΑ) είναι άρρηκτα συνδεδεμένο με την μιτοχονδριακή δυσλειτουργία καθώς τα μιτοχόνδρια αποτελούν τόσο πηγή όσο και στόχο των ελεύθερων ριζών ¹¹⁵ αλλά και ότι τα επίπεδα αυτοφαγίας-μιτοφαγίας, της βασικής κυτταρικής διαδικασίας για την αποδόμηση των ελαττωματικών μιτοχονδρίων είναι μειωμένα στην οστεοαρθρίτιδα ¹¹⁰ προσπαθήσαμε

να δούμε αν όντως παρατηρείται αύξηση των ελαττωματικών μορφολογικά μιτοχονδρίων στα οστεοαρθρικά χονδροκύτταρα σε σχέση με τα φυσιολογικά. Ένας βασικός τρόπος προκειμένου να συμπεράνουμε την ύπαρξη ελαττωματικών μορφολογικά μιτοχονδρίων είναι μέσω χρώσης τους και παρατήρησής τους στο μικροσκόπιο για τον εντοπισμό ή όχι του φαινομένου ‘bubbling’ (διογκωμένα στρογγυλά σαν ‘φούσκες’) ¹²⁸. Παρατηρήθηκε ότι το ποσοστό των οστεοαρθρικών χονδροκυττάρων που εμφάνιζαν το φαινόμενο ‘bubbling’ έπειτα απο την χρώση για τα μιτοχόνδρια ήταν πολύ μεγαλύτερο έναντι των φυσιολογικών χονδροκυττάρων στα οποία σχεδόν δεν παρατηρήθηκε το συγκεκριμένο φαινόμενο. Έτσι η συγκεκριμένη παρατήρηση ότι τα οστεοαρθρικά χονδροκύτταρα εμφανίζουν μορφολογικά ελαττωματικά μιτοχόνδρια έρχεται σε συμφωνία με τις μέχρι τώρα υποψίες μας αλλά και με αντίστοιχες μελέτες από άλλες ερευνητικές ομάδες.

Συμπερασματικά οι διαφορές που εντοπίστηκαν στα μεταγραφικά και πρωτεϊνικά επίπεδα των υπό μελέτη αυτοφαγικών γονιδίων χωρίς ή έπειτα απο την επίδραση με οξειδωτικό στρες ανάμεσα στα οστεοαρθρικά και φυσιολογικά χονδροκύτταρα αλλά και οι διαφορές στην μορφολογία των μιτοχονδρίων τους που σχετίζεται με την μιτοφαγία και το οξειδωτικό στρες υποδηλώνουν την εμπλοκή ρύθμισης μέσω του οξειδωτικού στρες της αυτοφαγίας και την πιθανή εμπλοκή της απορρύθμισης που παρατηρούμε στην αιτιοπαθολογία της ΟΑ.

Προκειμένου να επέλθει καλύτερη κατανόηση των μηχανισμών που διέπουν την ρύθμιση των αυτοφαγικών γονιδίων μέσω του οξειδωτικού στρες στην οστεοαρθρίτιδα προτείνουμε μελλοντικά να γίνουν επιπλέον πειράματα. Η μελέτη περισσότερων δειγμάτων με επιδράσεις αποτελεί κύριο στόχο. Επιπλέον χρήση αναστολέων γονιδίων κλειδιών της αυτοφαγίας τόσο *in vitro* όσο και *in vivo* με ή χωρίς επιπλέον επίδραση με οξειδωτικό στρες σε φυσιολογικά χονδροκύτταρα θα μπορούσε να αποτελέσει μελλοντικό στόχο. Χρώση και παρατήρηση μιτοχονδρίων από οστεοαρθρικά και φυσιολογικά χονδροκύτταρα έπειτα απο επιδράσεις και ανάκαμψη θα μπορούσε να οδηγήσει σε καλύτερη κατανόηση της μιτοχονδριακής δυσλειτουργίας που επάγεται απο την περίσσεια οξειδωτικού στρες και την μείωση της μιτοφαγίας. Επαγωγή αυτοφαγίας σε οστεοαρθρικά χονδροκύτταρα και παρατήρηση της μορφολογίας τους θα μπορούσε να αποτελέει ένα ακόμη μελλοντικό στόχο για διερεύνηση.

E. Βιβλιογραφία

1. Loeser, R. F., Goldring, S. R., Scanzello, C. R. & Goldring, M. B. Arthritis & Rheumatism. *Arthritis Rheum.* **64**, 1697–1707 (2012).
2. Xia, B. *et al.* Osteoarthritis Pathogenesis: A Review of Molecular Mechanisms. *Calcified Tissue International* **95**, 495–505 (2014).
3. Poulet, B. & Staines, K. A. New developments in osteoarthritis and cartilage biology. *Curr. Opin. Pharmacol.* **28**, 8–13 (2016).
4. Ramos, Y. F. M. & Meulenbelt, I. The role of epigenetics in osteoarthritis. *Curr. Opin. Rheumatol.* **29**, 119–129 (2017).
5. Loeser, R. F. Aging processes and the development of osteoarthritis. *Curr. Opin. Rheumatol.* **25**, 108–113 (2013).
6. Kellgren, J. H. & Lawrence, J. S. Radiological assessment of osteo-arthritis. *Ann. Rheum. Dis.* **16**, 494–502 (1957).
7. Guccione, A. A. *et al.* The effects of specific medical conditions on the functional limitations of elders in the Framingham Study. *Am. J. Public Health* **84**, 351–8 (1994).
8. Helmick, C. G. *et al.* Estimates of the prevalence of arthritis and other rheumatic conditions in the United States: Part I. *Arthritis Rheum.* **58**, 15–25 (2008).
9. Zhang, Y. *et al.* Prevalence of symptomatic hand osteoarthritis and its impact on functional status among the elderly: The Framingham Study. *Am. J. Epidemiol.* **156**, 1021–7 (2002).
10. Felson, D. T. *et al.* The prevalence of knee osteoarthritis in the elderly. The Framingham Osteoarthritis Study. *Arthritis Rheum.* **30**, 914–8 (1987).
11. Jordan, J. M. *et al.* Prevalence of knee symptoms and radiographic and symptomatic knee osteoarthritis in African Americans and Caucasians: the Johnston County Osteoarthritis Project. *J. Rheumatol.* **34**, 172–80 (2007).
12. Jordan, J. M. *et al.* Prevalence of hip symptoms and radiographic and symptomatic hip osteoarthritis in African Americans and Caucasians: the

- Johnston County Osteoarthritis Project. *J. Rheumatol.* **36**, 809–15 (2009).
13. Zhang, Y. & Jordan, J. M. Epidemiology of osteoarthritis. *Clin. Geriatr. Med.* **26**, 355–69 (2010).
 14. Johnson, V. L. & Hunter, D. J. The epidemiology of osteoarthritis. *Best Pract. Res. Clin. Rheumatol.* **28**, 5–15 (2014).
 15. Blagojevic, M., Jinks, C., Jeffery, A. & Jordan, K. P. Risk factors for onset of osteoarthritis of the knee in older adults: a systematic review and meta-analysis. *Osteoarthr. Cartil.* **18**, 24–33 (2010).
 16. Felson, D. T. *et al.* Osteoarthritis: new insights. Part 1: the disease and its risk factors. *Ann. Intern. Med.* **133**, 635–46 (2000).
 17. Srikanth, V. K. *et al.* A meta-analysis of sex differences prevalence, incidence and severity of osteoarthritis. *Osteoarthr. Cartil.* **13**, 769–781 (2005).
 18. Hanna, F. S. *et al.* Osteoarthritis and the postmenopausal woman: Epidemiological, magnetic resonance imaging, and radiological findings. *Semin. Arthritis Rheum.* **34**, 631–6 (2004).
 19. Nevitt, M. C., Felson, D. T., Williams, E. N. & Grady, D. The effect of estrogen plus progestin on knee symptoms and related disability in postmenopausal women: The heart and estrogen/progestin replacement study, a randomized, double-blind, placebo-controlled trial. *Arthritis Rheum.* **44**, 811–818 (2001).
 20. Nevitt, M. C. *et al.* Very low prevalence of hip osteoarthritis among Chinese elderly in Beijing, China, compared with whites in the United States: The Beijing osteoarthritis study. *Arthritis Rheum.* **46**, 1773–1779 (2002).
 21. Spector, T. D. & MacGregor, A. J. Risk factors for osteoarthritis: genetics. *Osteoarthr. Cartil.* **12 Suppl A**, S39–44 (2004).
 22. Palotie, A. *et al.* Predisposition to familial osteoarthritis linked to type II collagen gene. *Lancet (London, England)* **1**, 924–7 (1989).
 23. Chapman, K. *et al.* A meta-analysis of European and Asian cohorts reveals a global role of a functional SNP in the 5' UTR of GDF5 with osteoarthritis

- susceptibility. *Hum. Mol. Genet.* **17**, 1497–1504 (2008).
24. Kerkhof, H. J. M. *et al.* A genome-wide association study identifies a locus on chromosome 7q22 to influence susceptibility for osteoarthritis. *Arthritis Rheum.* **62**, NA-NA (2010).
 25. Chapman, K. *et al.* Osteoarthritis-susceptibility locus on chromosome 11q, detected by linkage. *Am. J. Hum. Genet.* **65**, 167–74 (1999).
 26. Evangelou, E. *et al.* Large-scale analysis of association between *GDF5* and *FRZB* variants and osteoarthritis of the hip, knee, and hand. *Arthritis Rheum.* **60**, 1710–1721 (2009).
 27. Valdes, A. M. *et al.* The *GDF5* rs143383 polymorphism is associated with osteoarthritis of the knee with genome-wide statistical significance. *Ann. Rheum. Dis.* **70**, 873–875 (2011).
 28. van Meurs, J. B. J. *et al.* A functional polymorphism in the catechol-O-methyltransferase gene is associated with osteoarthritis-related pain. *Arthritis Rheum.* **60**, 628–629 (2009).
 29. Evangelou, E. *et al.* A meta-analysis of genome-wide association studies identifies novel variants associated with osteoarthritis of the hip. *Ann. Rheum. Dis.* **73**, 2130–2136 (2014).
 30. Jiang, L. *et al.* Body mass index and susceptibility to knee osteoarthritis: A systematic review and meta-analysis. *Jt. Bone Spine* **79**, 291–297 (2012).
 31. Felson, D. T., Zhang, Y., Anthony, J. M., Naimark, A. & Anderson, J. J. Weight loss reduces the risk for symptomatic knee osteoarthritis in women. The Framingham Study. *Ann. Intern. Med.* **116**, 535–9 (1992).
 32. Christensen, R., Bartels, E. M., Astrup, A. & Bliddal, H. Effect of weight reduction in obese patients diagnosed with knee osteoarthritis: a systematic review and meta-analysis. *Ann. Rheum. Dis.* **66**, 433–439 (2006).
 33. Zhang, W. Risk factors of knee osteoarthritis – excellent evidence but little has been done. *Osteoarthr. Cartil.* **18**, 1–2 (2010).
 34. McAlindon, T. E. *et al.* Do antioxidant micronutrients protect against the

- development and progression of knee osteoarthritis? *Arthritis Rheum.* **39**, 648–56 (1996).
35. Felson, D. T. *et al.* Low levels of vitamin D and worsening of knee osteoarthritis: Results of two longitudinal studies. *Arthritis Rheum.* **56**, 129–136 (2007).
 36. McAlindon, T. E. *et al.* Relation of dietary intake and serum levels of vitamin D to progression of osteoarthritis of the knee among participants in the Framingham Study. *Ann. Intern. Med.* **125**, 353–9 (1996).
 37. Neogi, T. *et al.* Low vitamin K status is associated with osteoarthritis in the hand and knee. *Arthritis Rheum.* **54**, 1255–1261 (2006).
 38. Felson, D. T. *et al.* Occupational physical demands, knee bending, and knee osteoarthritis: results from the Framingham Study. *J. Rheumatol.* **18**, 1587–92 (1991).
 39. Coggon, D. *et al.* Occupational physical activities and osteoarthritis of the knee. *Arthritis Rheum.* **43**, 1443–1449 (2000).
 40. Cooper, C., Campbell, L., Byng, P., Croft, P. & Coggon, D. Occupational activity and the risk of hip osteoarthritis. *Ann. Rheum. Dis.* **55**, 680–2 (1996).
 41. Hansen, P., English, M. & Willick, S. E. Does Running Cause Osteoarthritis in the Hip or Knee? *PM&R* **4**, S117–S121 (2012).
 42. Lohmander, L. S., Östenberg, A., Englund, M. & Roos, H. High prevalence of knee osteoarthritis, pain, and functional limitations in female soccer players twelve years after anterior cruciate ligament injury. *Arthritis Rheum.* **50**, 3145–3152 (2004).
 43. von Porat, A., Roos, E. M. & Roos, H. High prevalence of osteoarthritis 14 years after an anterior cruciate ligament tear in male soccer players: a study of radiographic and patient relevant outcomes. *Ann. Rheum. Dis.* **63**, 269–73 (2004).
 44. Neuman, P. *et al.* Prevalence of Tibiofemoral Osteoarthritis 15 Years After Nonoperative Treatment of Anterior Cruciate Ligament Injury: A Prospective Cohort Study. *Am. J. Sports Med.* **36**, 1717–1725 (2008).

45. Sharma, L. *et al.* The role of knee alignment in disease progression and functional decline in knee osteoarthritis. *JAMA* **286**, 188–95 (2001).
46. Dieppe, P. Developments in osteoarthritis. *Rheumatology* **50**, 245–247 (2011).
47. Martel-Pelletier, J. & Pelletier, J. P. Is osteoarthritis a disease involving only cartilage or other articular tissues? *Ekleml Hastalik. Cerrahisi* **21**, 2–14 (2010).
48. Goldring, M. B. & Goldring, S. R. Articular cartilage and subchondral bone in the pathogenesis of osteoarthritis. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **1192**, 230–237 (2010).
49. Sophia Fox, A. J., Bedi, A. & Rodeo, S. A. The basic science of articular cartilage: structure, composition, and function. *Sports Health* **1**, 461–8 (2009).
50. Goldring, M. B. & Marcu, K. B. Cartilage homeostasis in health and rheumatic diseases. *Arthritis Res. Ther.* **11**, 224 (2009).
51. Heijink, A. *et al.* Biomechanical considerations in the pathogenesis of osteoarthritis of the knee. *Knee Surg. Sports Traumatol. Arthrosc.* **20**, 423–35 (2012).
52. Buckwalter, J. A., Mankin, H. J. & Grodzinsky, A. J. Articular cartilage and osteoarthritis. *Instr. Course Lect.* **54**, 465–80 (2005).
53. Menkes, C. J. & Lane, N. E. Are osteophytes good or bad? *Osteoarthr. Cartil.* **12 Suppl A**, S53-4 (2004).
54. Buckland-Wright, C. Subchondral bone changes in hand and knee osteoarthritis detected by radiography. *Osteoarthr. Cartil.* **12 Suppl A**, S10-9 (2004).
55. Brandt, K. D., Dieppe, P. & Radin, E. Etiopathogenesis of Osteoarthritis. *Med. Clin. North Am.* **93**, 1–24 (2009).
56. Blom, A. B. *et al.* Crucial role of macrophages in matrix metalloproteinase-mediated cartilage destruction during experimental osteoarthritis: involvement of matrix metalloproteinase 3. *Arthritis Rheum.* **56**, 147–57 (2007).
57. Englund, M. The Role of the Meniscus in Osteoarthritis Genesis. *Med. Clin. North Am.* **93**, 37–43 (2009).
58. Sun, Y. *et al.* Histological examination of collagen and proteoglycan changes in osteoarthritic menisci. *Open Rheumatol. J.* **6**, 24–32 (2012).

59. Burke, J. *et al.* Therapeutic potential of mesenchymal stem cell based therapy for osteoarthritis. *Clin. Transl. Med.* **5**, 27 (2016).
60. Katz, J. Total joint replacement in osteoarthritis. *Best Pract. Res. Clin. Rheumatol.* **20**, 145–153 (2006).
61. Vaishya, R., Pariyo, G. B., Agarwal, A. K. & Vijay, V. Non-operative management of osteoarthritis of the knee joint. *J. Clin. Orthop. trauma* **7**, 170–6 (2016).
62. Adam-Vizi, V. & Chinopoulos, C. Bioenergetics and the formation of mitochondrial reactive oxygen species. *Trends Pharmacol. Sci.* **27**, 639–45 (2006).
63. Turrens, J. F. Mitochondrial formation of reactive oxygen species. *J. Physiol.* **552**, 335–44 (2003).
64. Chance, B. & Williams, G. R. Respiratory enzymes in oxidative phosphorylation. I. Kinetics of oxygen utilization. *J. Biol. Chem.* **217**, 383–93 (1955).
65. Matsumoto, H., Silverton, S. F., Debolt, K. & Shapiro, I. M. Superoxide dismutase and catalase activities in the growth cartilage: relationship between oxidoreductase activity and chondrocyte maturation. *J. Bone Miner. Res.* **6**, 569–74 (1991).
66. Sen, C. K. Oxygen toxicity and antioxidants: state of the art. *Indian J. Physiol. Pharmacol.* **39**, 177–96 (1995).
67. Lepetsos, P. & Papavassiliou, A. G. ROS/oxidative stress signaling in osteoarthritis. *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Basis of Disease* **1862**, 576–591 (2016).
68. Nathan, C. Nitric oxide as a secretory product of mammalian cells. *FASEB J.* **6**, 3051–64 (1992).
69. Hanafy, K. A., Krumenacker, J. S. & Murad, F. NO, nitrotyrosine, and cyclic GMP in signal transduction. *Med. Sci. Monit.* **7**, 801–19 (2001).
70. Hess, D. T., Matsumoto, A., Kim, S.-O., Marshall, H. E. & Stamler, J. S.

- Protein S-nitrosylation: purview and parameters. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **6**, 150–66 (2005).
71. Greenwald, R. A. Oxygen radicals, inflammation, and arthritis: pathophysiological considerations and implications for treatment. *Semin. Arthritis Rheum.* **20**, 219–40 (1991).
 72. Henrotin, Y. E., Bruckner, P. & Pujol, J.-P. L. The role of reactive oxygen species in homeostasis and degradation of cartilage. *Osteoarthr. Cartil.* **11**, 747–55 (2003).
 73. Esterbauer, H., Schaur, R. J. & Zollner, H. Chemistry and biochemistry of 4-hydroxynonenal, malonaldehyde and related aldehydes. *Free Radic. Biol. Med.* **11**, 81–128 (1991).
 74. Roberts, L. J. & Morrow, J. D. The generation and actions of isoprostanes. *Biochim. Biophys. Acta* **1345**, 121–35 (1997).
 75. Tiku, M. L., Gupta, S. & Deshmukh, D. R. Aggrecan degradation in chondrocytes is mediated by reactive oxygen species and protected by antioxidants. *Free Radic. Res.* **30**, 395–405 (1999).
 76. Funk, C. D. Prostaglandins and leukotrienes: advances in eicosanoid biology. *Science* **294**, 1871–5 (2001).
 77. Hardy, M. M. *et al.* Cyclooxygenase 2-dependent prostaglandin E2 modulates cartilage proteoglycan degradation in human osteoarthritis explants. *Arthritis Rheum.* **46**, 1789–803 (2002).
 78. Brigelius-Flohé, R., Banning, A., Kny, M. & Börl, G.-F. Redox events in interleukin-1 signaling. *Arch. Biochem. Biophys.* **423**, 66–73 (2004).
 79. Woo, C. H. *et al.* Tumor necrosis factor- α generates reactive oxygen species via a cytosolic phospholipase A2-linked cascade. *J. Biol. Chem.* **275**, 32357–62 (2000).
 80. Hiran, T. S., Moulton, P. J. & Hancock, J. T. Detection of superoxide and NADPH oxidase in porcine articular chondrocytes. *Free Radic. Biol. Med.* **23**, 736–43 (1997).

81. Jacques, C., Gosset, M., Berenbaum, F. & Gabay, C. The role of IL-1 and IL-1Ra in joint inflammation and cartilage degradation. *Vitam. Horm.* **74**, 371–403 (2006).
82. Mizushima, N. in *Current topics in microbiology and immunology* **335**, 71–84 (2009).
83. Tsukada, M. & Ohsumi, Y. Isolation and characterization of autophagy-defective mutants of *Saccharomyces cerevisiae*. *FEBS Lett.* **333**, 169–74 (1993).
84. Mizushima, N. & Komatsu, M. Autophagy: renovation of cells and tissues. *Cell* **147**, 728–41 (2011).
85. Todde, V., Veenhuis, M. & van der Klei, I. J. Autophagy: Principles and significance in health and disease. *Biochim. Biophys. Acta - Mol. Basis Dis.* **1792**, 3–13 (2009).
86. Mijaljica, D., Prescott, M. & Devenish, R. J. Microautophagy in mammalian cells: revisiting a 40-year-old conundrum. *Autophagy* **7**, 673–82 (2011).
87. Sahu, R. *et al.* Microautophagy of Cytosolic Proteins by Late Endosomes. *Dev. Cell* **20**, 131–139 (2011).
88. Bejarano, E. & Cuervo, A. M. Chaperone-Mediated Autophagy. *Proc. Am. Thorac. Soc.* **7**, 29–39 (2010).
89. He, C. & Klionsky, D. J. Regulation mechanisms and signaling pathways of autophagy. *Annu. Rev. Genet.* **43**, 67–93 (2009).
90. Chen, Y. & Klionsky, D. J. The regulation of autophagy - unanswered questions. *J. Cell Sci.* **124**, 161–170 (2011).
91. Onodera, J. & Ohsumi, Y. Autophagy is required for maintenance of amino acid levels and protein synthesis under nitrogen starvation. *J. Biol. Chem.* **280**, 31582–6 (2005).
92. Bergamini, E. Autophagy: a cell repair mechanism that retards ageing and age-associated diseases and can be intensified pharmacologically. *Mol. Aspects Med.* **27**, 403–10 (2006).

93. Saxton, R. A. & Sabatini, D. M. mTOR Signaling in Growth, Metabolism, and Disease. *Cell* **168**, 960–976 (2017).
94. Wullschleger, S., Loewith, R. & Hall, M. N. TOR Signaling in Growth and Metabolism. *Cell* **124**, 471–484 (2006).
95. Kim, J., Kundu, M., Viollet, B. & Guan, K.-L. AMPK and mTOR regulate autophagy through direct phosphorylation of Ulk1. *Nat. Cell Biol.* **13**, 132–41 (2011).
96. Kundu, M. ULK1, mammalian target of rapamycin, and mitochondria: linking nutrient availability and autophagy. *Antioxid. Redox Signal.* **14**, 1953–8 (2011).
97. Chan, E. Y. W., Longatti, A., McKnight, N. C. & Tooze, S. A. Kinase-inactivated ULK proteins inhibit autophagy via their conserved C-terminal domains using an Atg13-independent mechanism. *Mol. Cell. Biol.* **29**, 157–71 (2009).
98. Weidberg, H., Shvets, E. & Elazar, Z. Biogenesis and Cargo Selectivity of Autophagosomes. *Annu. Rev. Biochem.* **80**, 125–156 (2011).
99. Ohsumi, Y. Molecular dissection of autophagy: two ubiquitin-like systems. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **2**, 211–6 (2001).
100. Kabeya, Y. *et al.* LC3, a mammalian homologue of yeast Apg8p, is localized in autophagosome membranes after processing. *EMBO J.* **19**, 5720–8 (2000).
101. Kabeya, Y. *et al.* LC3, GABARAP and GATE16 localize to autophagosomal membrane depending on form-II formation. *J. Cell Sci.* **117**, 2805–12 (2004).
102. Tanida, I., Ueno, T. & Kominami, E. LC3 conjugation system in mammalian autophagy. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* **36**, 2503–2518 (2004).
103. Jäger, S. *et al.* Role for Rab7 in maturation of late autophagic vacuoles. *J. Cell Sci.* **117**, 4837–48 (2004).
104. Qiao, L. *et al.* Lysosomal enzyme cathepsin D protects against alpha-synuclein aggregation and toxicity. *Mol. Brain* **1**, 17 (2008).
105. Caramés, B., Taniguchi, N., Otsuki, S., Blanco, F. J. & Lotz, M. Autophagy is a protective mechanism in normal cartilage, and its aging-related loss is linked

- with cell death and osteoarthritis. *Arthritis Rheum.* **62**, 791–801 (2010).
106. Caramés, B., Olmer, M., Kiosses, W. B. & Lotz, M. K. The relationship of autophagy defects to cartilage damage during joint aging in a mouse model. *Arthritis Rheumatol. (Hoboken, N.J.)* **67**, 1568–76 (2015).
 107. Shapiro, I. M., Layfield, R., Lotz, M., Settembre, C. & Whitehouse, C. Boning up on autophagy: the role of autophagy in skeletal biology. *Autophagy* **10**, 7–19 (2014).
 108. Barranco, C. Osteoarthritis: Activate autophagy to prevent cartilage degeneration? *Nat. Rev. Rheumatol.* **11**, 127 (2015).
 109. Zhang, Y. *et al.* Cartilage-specific deletion of mTOR upregulates autophagy and protects mice from osteoarthritis. *Ann. Rheum. Dis.* 1–9 (2014).
 110. López de Figueroa, P., Lotz, M. K., Blanco, F. J. & Caramés, B. Autophagy activation and protection from mitochondrial dysfunction in human chondrocytes. *Arthritis Rheumatol. (Hoboken, N.J.)* **67**, 966–76 (2015).
 111. Sasaki, H. *et al.* Autophagy modulates osteoarthritis-related gene expression in human chondrocytes. *Arthritis Rheum.* **64**, 1920–1928 (2012).
 112. Boudierlique, T. *et al.* Targeted deletion of Atg5 in chondrocytes promotes age-related osteoarthritis. *Ann. Rheum. Dis.* **75**, 627–31 (2016).
 113. Bohensky, J. *et al.* HIF-1 regulation of chondrocyte apoptosis: induction of the autophagic pathway. *Autophagy* **3**, 207–14 (2007).
 114. Cuervo, A. M. & Dice, J. F. Age-related Decline in Chaperone-mediated Autophagy. *J. Biol. Chem.* **275**, 31505–31513 (2000).
 115. Murphy, M. P. How mitochondria produce reactive oxygen species. *Biochem. J.* **417**, 1–13 (2009).
 116. Scherz-Shouval, R. *et al.* Reactive oxygen species are essential for autophagy and specifically regulate the activity of Atg4. *EMBO J.* **26**, 1749–60 (2007).
 117. Scherz-Shouval, R. & Elazar, Z. Regulation of autophagy by ROS: physiology and pathology. *Trends Biochem. Sci.* **36**, 30–8 (2011).
 118. Chen, Y., Azad, M. B. & Gibson, S. B. Superoxide is the major reactive

- oxygen species regulating autophagy. *Cell Death Differ.* **16**, 1040–1052 (2009).
119. Murphy, M. P. Induction of mitochondrial ROS production by electrophilic lipids: a new pathway of redox signaling? *AJP Hear. Circ. Physiol.* **290**, H1754–H1755 (2006).
 120. Itoh, K. *et al.* Keap1 represses nuclear activation of antioxidant responsive elements by Nrf2 through binding to the amino-terminal Neh2 domain. *Genes Dev.* **13**, 76–86 (1999).
 121. Talalay, P., De Long, M. J. & Prochaska, H. J. Identification of a common chemical signal regulating the induction of enzymes that protect against chemical carcinogenesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **85**, 8261–5 (1988).
 122. Fujita, K., Maeda, D., Xiao, Q. & Srinivasula, S. M. Nrf2-mediated induction of p62 controls Toll-like receptor-4-driven aggresome-like induced structure formation and autophagic degradation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **108**, 1427–32 (2011).
 123. Martindale, J. L. & Holbrook, N. J. Cellular response to oxidative stress: signaling for suicide and survival. *J. Cell. Physiol.* **192**, 1–15 (2002).
 124. Crighton, D. *et al.* DRAM, a p53-Induced Modulator of Autophagy, Is Critical for Apoptosis. *Cell* **126**, 121–134 (2006).
 125. Budanov, A. V & Karin, M. p53 target genes sestrin1 and sestrin2 connect genotoxic stress and mTOR signaling. *Cell* **134**, 451–60 (2008).
 126. Egan, D. F. *et al.* Phosphorylation of ULK1 (hATG1) by AMP-activated protein kinase connects energy sensing to mitophagy. *Science* **331**, 456–61 (2011).
 127. Jolly, R. D., Brown, S., Das, A. M. & Walkley, S. U. Mitochondrial dysfunction in the neuronal ceroid-lipofuscinoses (Batten disease). *Neurochem. Int.* **40**, 565–71 (2002).
 128. Leonard, A. P. *et al.* Quantitative analysis of mitochondrial morphology and membrane potential in living cells using high-content imaging, machine learning, and morphological binning. *Biochim. Biophys. Acta* **1853**, 348–60

- (2015).
129. Yakes, F. M. & Van Houten, B. Mitochondrial DNA damage is more extensive and persists longer than nuclear DNA damage in human cells following oxidative stress. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **94**, 514–9 (1997).
 130. Menzies, R. A. & Gold, P. H. The turnover of mitochondria in a variety of tissues of young adult and aged rats. *J. Biol. Chem.* **246**, 2425–9 (1971).
 131. Lemasters, J. J. Selective mitochondrial autophagy, or mitophagy, as a targeted defense against oxidative stress, mitochondrial dysfunction, and aging. *Rejuvenation Res.* **8**, 3–5 (2005).
 132. Lee, J., Giordano, S. & Zhang, J. Autophagy, mitochondria and oxidative stress: cross-talk and redox signalling. *Biochem. J.* **441**, (2012).
 133. Caramés, B. *et al.* Autophagy activation by rapamycin reduces severity of experimental osteoarthritis. *Ann. Rheum. Dis.* **71**, 575–81 (2012).
 134. Wu, C. *et al.* Defective autophagy in chondrocytes with Kashin-Beck disease but higher than osteoarthritis. *Osteoarthr. Cartil.* **22**, 1936–46 (2014).
 135. Caramés, B., Taniguchi, N., Otsuki, S., Blanco, F. J. & Lotz, M. Autophagy is a protective mechanism in normal cartilage, and its aging-related loss is linked with cell death and osteoarthritis. *Arthritis Rheum.* **62**, 791–801 (2010).
 136. Cetrullo, S., D’Adamo, S., Guidotti, S., Borzì, R. M. & Flamigni, F. Hydroxytyrosol prevents chondrocyte death under oxidative stress by inducing autophagy through sirtuin 1-dependent and -independent mechanisms. *Biochim. Biophys. Acta - Gen. Subj.* **1860**, 1181–1191 (2016).
 137. López de Figueroa, P., Lotz, M. K., Blanco, F. J. & Caramés, B. Autophagy activation and protection from mitochondrial dysfunction in human chondrocytes. *Arthritis Rheumatol. (Hoboken, N.J.)* **67**, 966–76 (2015).
 138. Lepetsos, P. & Papavassiliou, A. G. ROS/oxidative stress signaling in osteoarthritis. *Biochim. Biophys. Acta* **1862**, 576–91 (2016).
 139. Hosseinzadeh, A. *et al.* Apoptosis signaling pathways in osteoarthritis and possible protective role of melatonin. *J. Pineal Res.* **61**, 411–425 (2016).

140. Fleming, A., Noda, T., Yoshimori, T. & Rubinsztein, D. C. Chemical modulators of autophagy as biological probes and potential therapeutics. *Nat. Chem. Biol.* **7**, 9–17 (2011).

Εικόνες απο διαδίκτυο:

(1) <http://www.progressiveptinc.com/wp/wp-content/uploads/2013/05/Normal-Knee-OA-Knee.jpg>